



**Der Einfluss des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine auf die zelluläre  
Differenzierung von Motoneuronen eines Mausmodells für Spinale  
Muskelatrophie Typ 1 (SMA)**

**The effect of the calcium channel agonist R-Roscovitine on cellular  
differentiation of motoneurons from a mouse model for spinal muscular  
atrophy type 1 (SMA)**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neurowissenschaften

Vorgelegt von

**Stefanie Margarete Balk**

aus

**Pegnitz**

Würzburg, 2019

**Eingereicht am: 13. Mai 2019**

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r: Prof. Dr. med. Wolfgang Kastenmüller**

**1. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. rer.-nat. Sibylle Jablonka**

**2. Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Sendtner**

**3. Betreuer: Prof. Dr. med. Esther Asan**

**Tag des Promotionskolloquiums: 03. September 2019**

**Doktorurkunden ausgehändigt am: .....**

*Für meine Eltern, meine Geschwister und meine Freunde*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	9
<b>2. Einleitung</b>	13
2.1 Motoneurone und Motoneuronerkrankungen	13
2.1.1 Allgemeine Entwicklung von Motoneuronen	14
2.1.2 Differenzierung der Motoneurone durch Kalziumkanäle	14
2.1.3 Differenzierung der Motoneurone durch Laminine	17
2.1.4 Differenzierung der Motoneurone durch Neurotrophe Faktoren	18
2.2 Spinale Muskelatrophie	19
2.2.1 Klinik	19
2.2.2 Genetik	20
2.2.3 Tiermodelle	22
2.2.4 Pathogenese	23
2.2.5 Behandlungsstrategien	24
2.2.6 SMARD1 als Sonderform	25
<b>3. Zielsetzung</b>	27
<b>4. Material und Methoden</b>	29
4.1 Material	29
4.1.1 Tiere	29
4.1.2 Chemikalien und Zusätze	29
4.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	31
4.1.4 Enzyme	33
4.1.5 Primer	33
4.1.6 Antikörper	33
4.1.7 Technische Geräte	34
4.1.8 Verbrauchsmaterialien	35
4.1.9 Software	35
4.2 Methoden	35
4.2.1 Mausmodelle	35
4.2.2 Primäre embryonale Motoneuronen-Zellkultur	37
4.2.3 Genotypisierung	39
4.2.4 Überlebensanalyse primärer Motoneurone	40
4.2.5 Immunzytochemie primärer Motoneurone	41

4.2.6 Morphologische Zielgrößen	41
4.2.7 Calcium Imaging	42
4.2.8 Western Blot	44
4.2.9 Statistik	45
<b>5. Ergebnisse</b>	46
5.1 Der Einfluss von R-Roscovitine auf das Überleben und die Differenzierung von Motoneuronen aus einem Mausmodell für SMA Typ 1	46
5.1.1 Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von R- und S-Roscovitine auf das Überleben wildtypischer Motoneurone	46
5.1.2 Der Vergleich von Ca <sub>v</sub> 2.2-Agonisten und Cdk5-Inhibitoren in Bezug auf die Axonlängen von SMA-Motoneuronen	49
5.1.3 Der Einfluss von R-Roscovitine auf die Differenzierung des Wachstumskegels in SMA-Motoneuronen	52
5.1.4 Der Einfluss von Ca <sub>v</sub> 2.2 Agonisten und Antagonisten auf die spontanen Kalziumtransienten in SMA-Motoneuronen	54
5.1.5 Der Einfluss von R-Roscovitine auf die Proteinmenge von SMN und Cdk5 in SMA-Motoneuronen	59
5.1.6 Der Einfluss von R-Roscovitine auf spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem Cdk5 <sup>-/-</sup> Mausmodell	60
5.2 Der Einfluss neurotropher Faktoren auf spontane Kalziumtransienten in wild-typischen embryonalen Motoneuronen	62
5.2.1 Spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem trkB <sup>TK-/-</sup> Mausmodell	62
5.2.2 Der Langzeiteinfluss von BDNF, CNTF und GDNF auf spontane Kalziumtransienten	62
5.2.3 Spontane Kalziumtransienten nach akuter Applikation von BDNF	64
5.3 Spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem Nmd <sup>2J</sup> Mausmodell	66
<b>6. Diskussion</b>	67
6.1 Die Wirkung von R-Roscovitine auf die Entwicklung der SMA-Motoneurone	67
6.2 Der Wirkmechanismus von R-Roscovitine auf zellulärer Ebene	69
6.3 Der indirekte Einfluss neurotropher Faktoren auf den Ca <sub>v</sub> 2.2 Kalziumkanal	77
6.4 Kalziumtransienten an der neuromuskulären Endplatte bei SMARD1	79
6.5 Die klinische Anwendung der untersuchten Substanz Roscovitine	80
<b>7. Ausblick</b>	81

<b>8. Anhang</b>	82
8.1 Abbildungsverzeichnis	82
8.2 Literaturverzeichnis	83
8.3 Danksagung	108
8.4 Publikationsliste	110
8.5 Eidesstattliche Erklärung	111

## Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Lentivirus
Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AM-Ester	Acetoxylester
ASO	Antisense Oligonukleotid
AVI	<i>Audio Video Interleave</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Zyclin-abhängige Kinase)
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
DIV	<i>days in vitro</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DSMA1	Distale spinale Muskelatrophie 1
GDNF	<i>glial cell-line derived neurotrophic factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IP3	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
LED	<i>light-emitting diodes</i>
LEMS	Lambert-Eaton-Myasthenie Syndrom
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
NCT	offizielle Identifikationsnummer für klinische Studien
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NT-3/4/5	<i>neurotrophic factor 3/4/5</i>
OG	<i>Oregon Green</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SMA	Spinale Muskelatrophie

SMARD1	<i>spinal muscular atrophie with respiratory distress 1</i>
SMN	<i>survival motoneuron (Gen)</i>
SMN $\Delta$ 7	<i>survival motoneuron delta 7 (ohne Exon 7)</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
Trk	Tyrosin-Rezeptor-Kinase



## 1. Zusammenfassung

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine monogenetische Erkrankung, bei der es durch den Verlust des SMN Proteins zur Degeneration der  $\alpha$ -Motoneurone im Rückenmark kommt. Abhängig vom Schweregrad zeigen die Patienten bereits innerhalb der ersten Lebensmonate ausgeprägte Lähmungen der Skelettmuskulatur und eine Zwerchfellparese einhergehend mit einer reduzierten Lebenserwartung. Mithilfe von Mausmodellen für die SMA konnte gezeigt werden, dass der Motoneuronenverlust bei Smn-defizienten Mäusen mit Störungen der Neurotransmission an der motorischen Endplatte und mit Differenzierungsstörungen der Motoneurone einhergeht. Die Differenzierungsstörungen primärer Smn-defizienter Motoneurone sind eng gekoppelt mit einer verminderten Clusterbildung spannungsabhängiger Kalziumkanäle im distalen axonalen Bereich. Dies wiederum führt zu einer verminderten Frequenz spontaner Kalziumeinströme am Axonterminus und hat eine veränderte axonale Elongation zur Folge.

Es wurden folgende Aspekte in Bezug auf die Verstärkung und die Induktion spontaner Kalziumeinströme in Mausmodellen für spinale Muskelatrophien in dieser Arbeit adressiert:

- 1) Lassen sich spontane Kalziumeinströme in Smn-defizienten Motoneuronen durch die externe Applikation von Kalziumkanalagonisten verstärken?
- 2) Sind spontane Kalziumeinströme in primären Motoneuronen durch den *Brain-derived-neurotrophic-factor* (BDNF) induzierbar?
- 3) Zeigen primäre Motoneurone eines Mausmodells für spinale Muskelatrophie mit Ateminsuffizienz Typ 1 (SMARD1) ebenfalls veränderte Kalziumtransienten?

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass durch den Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine die Frequenz der spontanen Kalziumeinströme im distalen Axon von Smn-defizienten Motoneuronen signifikant erhöht wird. Dies hat wiederum einen regulierenden Effekt auf die Differenzierung der SMA Motoneurone zur Folge. Smn-defiziente Motoneurone zeigen somit keine Unterschiede mehr in Bezug auf Axonlängen und Wachstumskegelflächen im Vergleich zu Kontrollzellen. Für R-

Roscovitine ist neben der agonistischen Wirkung am Kalziumkanal auch ein inhibitorischer Effekt auf die Cyclin-abhängige Kinase 5 beschrieben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die erhöhten Kalziumtransienten unter der Behandlung mit R-Roscovitine durch eine direkte Bindung an die  $Ca_v2$  Kalziumkanäle verursacht werden und nicht durch eine Cdk5 Blockade. Dafür spricht die schnelle und reversible Wirkung von R-Roscovitine, sowie die Aufhebung des R-Roscovitines Effekts bei gleichzeitiger Gabe des  $Ca_v2.2$  Antagonisten  $\omega$ -Conotoxin MVIIC.

Der zweite Aspekt dieser Arbeit behandelt den Einfluss der neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF auf die Kalziumtransienten am Wachstumskegel wildtypischer Motoneurone. Der Vergleich der neurotrophen Faktoren zeigt, dass nur BDNF eine induzierende Wirkung auf spontane Kalziumtransienten am Wachstumskegel hat.

Der letzte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Kalziumtransienten bei Motoneuronen aus dem  $Nmd^{2J}$  (SMARD1) Mausmodell. Die SMARD1 gilt als eigenständige Form der spinalen Muskelatrophien mit unterschiedlicher Genetik und unterschiedlichen klinischen Merkmalen. Die Motoneurone weisen in Bezug auf die Kalziumtransienten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und  $Nmd^{2J}$  Mutante auf. Es ergibt sich somit kein Hinweis darauf, dass die Degeneration der Motoneurone bei der SMARD1 von einer Störung der Kalziumhomöostase im distalen axonalen Bereich ausgeht.

## **Summary**

*Spinal muscular atrophy (SMA) is a monogenetic disorder which is caused by the loss of the SMN Protein and leads to the degeneration of  $\alpha$ -motoneurons. Within the first few months of life most patients are clinically affected with severe motor deficits of skeletal muscles and a diaphragm paralysis, going along with a reduced life expectancy depending on the degree of severity. With the aid of SMA mouse models it was shown that the loss of motoneurons with *Smn* deficiency lies in an impaired neurotransmission of the motoneuron endplate leading to a differentiation disorder of the motoneurons. This differentiation disorder is strongly connected to a reduced cluster formation of voltage-dependent calcium channels in the distal axonal area. The impaired cluster formation in turn leads to a reduced frequency of spontaneous calcium transients at the axon terminus, followed by an altered axonal elongation.*

*In this work the following aspects concerning the enhancement and induction of spontaneous calcium transients in mouse models of spinal muscular atrophy were addressed:*

- 1) Does the external application of calcium channel agonists increase spontaneous calcium transients in *Smn*-deficient motoneurons?*
- 2) Is the neurotrophic factor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) able to induce spontaneous calcium transients in primary motoneurons?*
- 3) Do primary motoneurons of a mouse model for spinal muscular atrophy with respiratory distress (*SMARD1*) show altered calcium transients as well?*

*The results of my work show that the calcium channel agonist R-Roscovitine significantly increases the frequency of spontaneous calcium transients in growth cones of *Smn*-deficient motoneurons which in turn has a regulatory effect on the differentiation of SMA motoneurons. *Smn*-deficient motoneurons treated with R-Roscovitine do not show any differences concerning axon length and growth cone size compared to control cells. Apart from the agonist effect on the calcium channels, R-Roscovitine also has an inhibitory impact on the cyclin-dependant kinase 5. The results of this work show that the positive effect on the calcium*

*transients under R-Roscovotine treatment is because R-Roscovotine binds directly to the calcium channel rather than due to an inhibition of cdk5. Arguments supporting this idea are the rapid and reversible channel kinetics of R-Roscovotine. Plus, the effect of R-Roscovotine can be repealed when the Ca<sub>v</sub>2 channel antagonist  $\omega$ -conotoxin is given simultaneously.*

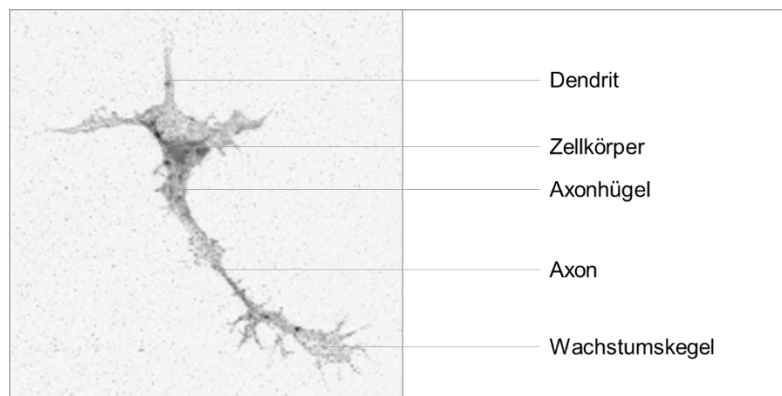
*In the second part of this work the influence of the neurotrophic factors BDNF, CNTF and GDNF on the calcium transients of wildtype motoneurons is investigated. Comparing these neurotrophic factors show that only BDNF has an impact on local calcium channel kinetics in growth cones of motoneurons.*

*The last part of this work deals with the investigation of calcium transients in motoneurons from the Nmd<sup>2J</sup> (SMARD1) mouse model. SMARD1 is an independent form of spinal muscular atrophies with different genetical and clinical aspects compared to proximal SMA. The results of this work show that Nmd<sup>2J</sup> motoneurons do not show any difference in growth cone calcium influx between wildtype and mutant. Thus, there is no indication that the degeneration of SMARD1 motoneurons has any pathophysiological similarities with motoneurons from the proximal SMA mouse model. Hence, there are also no indications that the reason for motoneuron degeneration in SMARD1 lies in an impaired calcium homeostasis in the distal axonal area.*

## 2. Einleitung

### 2.1 Motoneurone und Motoneuronerkrankungen

Motoneurone leiten ein Bewegungssignal vom Gehirn zum Muskel. Im motorischen Kortex, dem *Gyrus praecentralis* des Gehirns liegt das erste Motoneuron, das die elektrischen Signale über sein Axon an das zweite Motoneuron im Vorderhorn des Rückenmarks weitergibt. Am distalen Ende des zweiten Motoneurons befindet sich die neuromuskuläre Endplatte, die Synapse zwischen Motoneuron und Muskel. Dort wird das elektrische Signal in ein biochemisches Signal umgewandelt. Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines embryonalen Motoneurons in der Zellkultur. Apikal befinden sich die Dendriten, die die Signale anderer Neurone empfangen. Im Zellkörper werden die Signale verarbeitet. Am Axonhügel wird ein neuer elektrischer Impuls gebildet, der sich über das Axon fortleitet. Der Wachstumskegel markiert das Ende des Axons. Von ihm geht das Längenwachstum aus. Er bildet im Verlauf der embryonalen Entwicklung die spätere Verbindung mit der Muskelfaser.



#### **Abbildung 1: Zytologischer Aufbau eines primären embryonalen Motoneurons**

Eigene Aufnahme eines primären wildtypischen embryonalen Motoneurons in Zellkultur

Ist die Funktion des ersten Motoneurons gestört, entwickeln die Patienten spastische Paresen, da supranukleäre, hemmende Einflüsse auf das zweite Motoneuron im Rückenmark wegfallen. Erkrankungen aus diesem Formenkreis

sind die Hereditäre Spastische Spinalparalyse oder die Primäre Lateralsklerose. Liegt eine Störung im Bereich des zweiten Motoneurons vor, resultieren daraus schlaffe Paresen und in der Folge eine Atrophie der Muskulatur. Ein Untergang des zweiten Motoneurons kann entweder hereditär vorliegen wie bei den spinalen Muskelatrophien oder durch den Infektionserreger für die Poliomyelitis verursacht werden. Sind sowohl das erste Motoneuron als auch das zweite Motoneuron betroffen, handelt es sich um die Amyotrophe Lateralsklerose. Bei dieser meist rasch-progredienten Erkrankung entwickeln die Patienten gleichzeitig spastische und schlaffe Paresen mit einer klinisch ausgeprägten Muskelatrophie und einem gesteigerten Reflexniveau.

### **2.1.1 Allgemeine Entwicklung von Motoneuronen**

Motoneurone entwickeln sich aus der Basalplatte, der rostrokaudalen Achse des Neuralrohrs. Während der frühen embryonalen Entwicklung kontrollieren *Shh* und *Hox* Gene, welcher Motoneuron-Subtyp sich bildet und an welcher Stelle des Nervensystems sich das Motoneuron später befinden soll (Principles of neural sciences. 5. Aufl.; 2013). Im Anschluss erfolgt die Differenzierung der  $\alpha$ -Motoneurone und das Auswachsen der Axone zu den entsprechenden Muskelfasern. Für diesen Wachstumsvorgang werden spezifische neurotrophe Faktoren benötigen (siehe Kapitel 2.1.4).

### **2.1.2 Differenzierung der Motoneurone durch Kalziumkanäle**

Im Wachstumskegel existieren unterschiedliche Mechanismen, die für die Differenzierung verantwortlich sind und bei der SMA gestört sein können. Ein wichtiges Bindeglied verschiedener Differenzierungssignale bildet die Gruppe der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle. Für Motoneurone sind insbesondere der  $Ca_v2.1$  (P/Q-Typ) und der  $Ca_v2.2$  (N-Typ) Kalziumkanal von Bedeutung (Westenbroek *et al.*, 1998). Während der N-Typ nur in der embryonalen Entwicklung für das Motoneuron eine Rolle spielt, findet sich der P/Q-Typ sowohl während der Entwicklung als auch im ausgereiften Stadium am Wachstumskegel oder in der Präsynapse im Bereich der aktiven Zonen (Westenbroek *et al.*, 1995; Rosato Siri & Uchitel, 1999). Aktive Zonen bilden den Bereich der Präsynapse,

der für die Vesikelfreisetzung von Bedeutung ist (Schoch & Gundelfinger, 2006). Während der Embryonalentwicklung können sich diese spannungsabhängigen Kalziumkanäle spontan öffnen (Gu *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass insbesondere das Frequenzmuster der spontanen Kalziumtransienten für eine normale Reifung der neuromuskulären Endplatte verantwortlich ist (Gu & Spitzer, 1995; Spitzer, 2002). Der lokale Kalziumanstieg durch die spontane Öffnung der Kanäle führt zu einer Zusammenlagerung weiterer Kalziumkanäle an dieser Stelle (*Clusterbildung*). Kommt es nun zu einer Spannungsänderung der Zellmembran, wird in den Clustern der aktiven Zonen eine größere Menge an Kalziumkanälen geöffnet. Es strömt so viel Kalzium in die Zelle, dass Vesikel freigesetzt werden können. Die in den Vesikeln enthaltenen Neurotransmitter kommunizieren wiederum mit der extrazellulären Matrix und der Muskelfaser und treiben so die Differenzierung der neuromuskulären Endplatte voran (Nishimune *et al.*, 2004; Jablonka *et al.*, 2007).

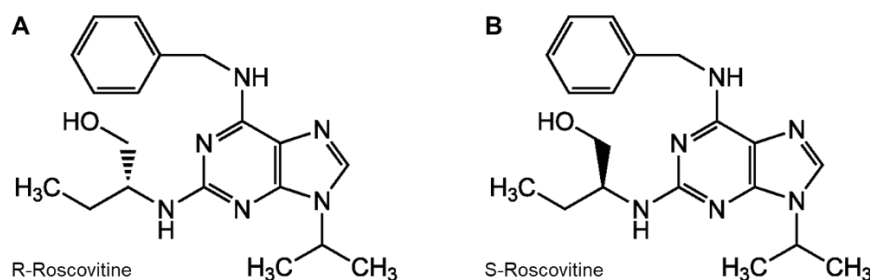
Spannungsabhängige Kalziumkanäle setzen sich aus mehreren Untereinheiten zusammen. Die  $\alpha 1$  Untereinheit bildet die Pore für den Kalziumstrom (Reuter, 1996). Die  $\beta$  Untereinheit liegt intrazellulär und hat eine regulatorische Funktion (Bouron *et al.*, 1995). Durch die Bindung synaptischer Proteine wie Syntaxin, SNAP25 und Synaptotagmin lässt sich dort die Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung modifizieren (Sheng *et al.*, 1996; Spafford & Zamponi, 2003). Auch Proteinkinasen setzen an der  $\beta$  Untereinheit an und können den Kanal durch Phosphorylierungen beeinflussen (Reuter, 1996). Beide Untereinheiten werden durch den transmembranären  $\alpha 2\delta$ -Komplex miteinander verbunden. Bei manchen Kanälen liegt eine zusätzliche  $\gamma$  Untereinheit vor (Catterall, 1998). Spannungsabhängige Kalziumkanäle folgen einer nicht-linearen Kinetik. Übersteigt das Membranpotenzial einen bestimmten Schwellenwert (N-Typ: + 7,8 mV bis + 10 mV; P/Q-Typ: - 11 mV bis + 2,1 mV) öffnet sich die Pore des Kalziumkanals und Kalzium strömt in die Zelle (Catterall *et al.*, 2005). Erst wenn durch die Öffnung mehrerer Kalziumkanäle an dieser Stelle die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf eine Gesamtkonzentration von etwa 200 nm ansteigt, kommt es dort zu einer Vesikelfreisetzung (Heidelberger *et al.*, 1994) Die Inaktivierung der Kalziumkanäle verläuft ebenfalls spannungsgesteuert (Patil *et*

*al.*, 1998). Es werden dabei mehrere *offen-* und *geschlossen-*Zustände durchlaufen (Lee *et al.*, 1999; Buraei *et al.*, 2005).

### *Agonisten und Antagonisten spannungsabhängiger Kalziumkanäle*

Die verschiedenen Typen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle lassen sich spezifisch blockieren. Conotoxin ( $\omega$ -CgTx-MVIIIC) ist ein Inhibitor für den N-Typ Kalziumkanal, Agatoxin ( $\omega$ -AgaIVA) ein Inhibitor für den P/Q-Typ Kanal (Katz *et al.*, 1996, 1997).

R-Roscovotine ist eine Substanz, die an den Cav2.2 Kalziumkanal bindet und dessen Öffnungszustand moduliert. Roscovitine (Seliciclib®) zählt zu den niedermolekularen Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 354,46 g/mol. Es setzt sich zusammen aus einer 2,6,9-trisubstituierten Purinbase und liegt durch die stereometrische Anordnung der Hydroxyethylaminogruppe als Enantiomer vor (Abbildung 2).



### **Abbildung 2: Roscovitine**

Abbildungen aus dem *Adipogen Lifescience DataSheet* für R- und für S-Roscovitine. Die Roscovitine Isoformen bestehen aus einer Purinbase, die an den Positionen 2, 6 und 9 trisubstituiert ist. R-Roscovitine unterscheidet sich von S-Roscovitine durch die stereometrische Anordnung der Hydroxyethylaminogruppe.

Für Roscovitine sind bis zum jetzigen Zeitpunkt zwei molekulare Angriffsorte in der Zelle beschrieben: Roscovitine wurde ursprünglich als Nachfolgesubstanz des spezifischen Kinase Inhibitors Olomucine entwickelt und ist charakterisiert durch seine antagonistische Wirkung an den Zyklin-abhängigen Kinasen Cdk1, Cdk2 und Cdk5. Davon wird Cdk5 am potentesten von R-Roscovitine gehemmt (Meijer *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 1997). Cdk5 ist insbesondere in neuronalem



Gewebe aktiv und hat im Gegensatz zu anderen Zyklin-abhängigen Kinasen nur eine geringe Wirkung auf den Zellzyklus. Erst später wurde gezeigt, dass Roscovitine auch in der Lage ist, spannungsabhängige Kalziumkanäle zu beeinflussen. Durch die Bindung an die Kanäle im offenen Zustand verzögert sich deren schnelle Schließung. Dadurch kann mehr Kalzium in das Zellinnere fließen. Die Enantiomere R-Roscovitine und S-Roscovitine unterscheiden sich dabei durch ihre Angriffsorte. R-Roscovitine zeigt sowohl eine antagonistische Wirkung an Cdk5 als auch eine agonistische Wirkung an den Cav2 Kalziumkanälen. Für S-Roscovitine wurde bisher vor allem eine antagonistische Wirkung an Cdk5 beschrieben (Cho & Meriney, 2006).

Die Substanz GV-58 wurde als Nachfolgesubstanz zu R-Roscovitine mit alleiniger Wirkung als Cav Agonist entwickelt (Liang *et al.*, 2012). Der Effekt an Cyclin-abhängigen Kinasen ist bei GV-58 etwa 20-fach geringer ausgeprägt als bei R-Roscovitine (Liang *et al.*, 2012). Für das Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom (LEMS), einer durch Antikörper verursachten neuromuskulären Übertragungsstörung, konnte in Zellmodellen gezeigt werden, dass der Einsatz von GV-58 die Deaktivierung der präsynaptischen Kalziumkanäle, gegen die die Antikörper gerichtet sind, verlangsamt und somit mehr Kalzium in den Wachstumskegel einströmt, was wiederum die Vesikelfreisetzung verbesserte (Tarr *et al.*, 2012; Tarr *et al.*, 2014).

### **2.1.3 Differenzierung der Motoneurone durch Laminine**

Laminine sind große Glykoproteine, die sich in der extrazellulären Matrix befinden und mit den Rezeptoren der Neurone interagieren. Sie setzen sich zusammen aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (Luckenbill-Edds, 1997). Laminin-111, bestehend aus den Polypeptidketten  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ , dient als Leitstruktur der Motoneurone während des Längenwachstums (Hammarback *et al.*, 1988). Laminin-221 findet sich im Bereich der neuromuskulären Endplatte und leitet dort die Differenzierung ein (Luckenbill-Edds, 1997). Dabei ist insbesondere die  $\beta 2$  Kette von Laminin-221 für die Differenzierung des distalen Motoneurons ausschlaggebend. Auf der  $\beta 2$  Kette befindet sich eine Tripeptidsequenz (LRE), die direkt an die porenbildende  $\alpha 1$ -Untereinheit der

spannungsabhängigen Kalziumkanäle Cav2.1 und Cav2.2 bindet (Porter *et al.*, 1995). Diese Bindung führt zur Öffnung der Kanäle und durch den lokalen Kalziumeinstrom zu einer Zusammenlagerung weiterer Kalziumkanäle an dieser Stelle (*Clusterbildung*). Durch die Clusterbildung kommt es wiederum zu einem Anstieg der Kalziumeinströme (Nishimune *et al.*, 2004; Jablonka *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass die erhöhte Frequenz der Kalziumtransienten von der Zelle als „Differenzierungssignal“ gewertet wird (Porter *et al.*, 1995). Dieses „Differenzierungssignal“ würde *in vivo* bedeuten, dass das Axonwachstum stoppt und sich die Präsynapse ausbildet. Daher sind die Axone der Motoneurone in Zellkultur auf Laminin-221 signifikant kürzer als auf Laminin-111 (Jablonka *et al.*, 2007).

#### **2.1.4 Differenzierung der Motoneurone durch Neurotrophe Faktoren**

Neurotrophe Faktoren sind Proteine, die das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von neuronalem Gewebe fördern. Zu den neurotrophen Faktoren zählt die Genfamilie der Neurotrophine mit den vier bisher bekannten Mitgliedern *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3) und *neurotrophin-4/5* (NT-4/5). Alle vier Faktoren sind in der Lage an den niedrig-affinen p75<sup>NGF</sup> Rezeptor und zusätzlich jeweils an verschiedene Klassen von Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk-Rezeptoren) zu binden (Sutter *et al.*, 1979; Johnson *et al.*, 1986; Glass & Yancopoulos, 1993). Der p75<sup>NGF</sup> Rezeptor hat keine eigene Aktivität, er beeinflusst die Entwicklung der Neuronen nur indirekt (Jing *et al.*, 1992; Glass & Yancopoulos, 1993). Die Bindung der Neurotrophine an die Trk-Rezeptoren führt zur Dimerisierung der Rezeptoren und hat eine Tyrosin-Autophosphorylierung zur Folge (Maher, 1988; Meakin & Shooter, 1991; Yarden & Ullrich, 1988). Die dadurch initiierten Signalkaskaden sind hauptverantwortlich für das Wachstum und die Differenzierung neuronaler Zellen (Weskamp & Reichardt, 1991; Klein *et al.*, 1991; Ibáñez *et al.*, 1992). BDNF, ein Mitglied der Neurotrophine und dessen Rezeptor TrkB wird eine Bedeutung bei Motoneuronen und bei der Entwicklung cholinergischer Zellen des Hippocampus zugeschrieben (Korsching *et al.*, 1985;

Hofer *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Ernfors *et al.*, 1990; Sendtner *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1992; Oppenheim *et al.*, 1992).

Neben den Neurotrophinen existieren weitere neurotrophe Faktoren. Dazu zählt der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF). Der Rezeptor für CNTF ist ein Zytokin-Rezeptor mit intrazellulärem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, der ausschließlich im Nervensystem und im Skelettmuskel exprimiert wird (Davis *et al.*, 1991). Ähnlich wie BDNF hat auch CNTF eine besondere Bedeutung für Motoneurone (Sendtner *et al.*, 1990; Arakawa *et al.*, 1990). Der *Glial cell-line derived neurotrophic factor* (GDNF) ist ebenfalls ein neurotropher Faktor. GDNF bindet an den GDNF $\alpha$ -Rezeptor, wodurch die RET Rezeptor-Tyrosinkinase phosphoryliert wird und so das Signal intrazellulär weiterleitet (Jing *et al.*, 1996; Treanor *et al.*, 1996). GDNF scheint wie BDNF und CNTF Einfluss auf das Überleben und die embryonale Entwicklung von Motoneuronen zu nehmen (Henderson *et al.*, 1994).

## **2.2 Spinale Muskelatrophie**

Die klassische proximal betonte spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine monogenetische Erkrankung, die zum Untergang des zweiten Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks führt. Die Inzidenz der SMA liegt zwischen 1:6000 und 1:10000, der Erbgang ist autosomal-rezessiv (Czeizel & Hamula, 1989).

### **2.2.1 Klinik**

Hauptaspekte der spinalen Muskelatrophien sind neben den Einschränkungen durch die proximalen Paresen und durch die Atrophie der Muskulatur auch gastrointestinale Störungen und orthopädische Probleme, die in der langfristigen Therapie der SMA berücksichtigt werden müssen. Respiratorische Insuffizienz und die damit in Zusammenhang stehenden Komplikationen beherrschen insbesondere bei den schweren Formen den klinischen Verlauf und damit auch die Prognose (Korinthenberg *et al.*, 2005).

Die Klassifikation der proximalen SMA richtet sich nach dem Schweregrad der Betroffenen und erfolgt nach Manifestationsalter, motorischen Meilensteinen und Langzeitprognose (Tabelle 1). Die häufigste Form ist die SMA Typ 1. Sie hat den

schwersten Verlauf mit Beginn innerhalb der ersten sechs Lebensmonate und dem Eintreten des Todes noch vor Erreichen des dritten Lebensjahres. Neugeborene zeigen häufig eine bereits ausgeprägte Schwäche mit muskulärer Hypotonie („*floppy infant*“) (Neurologie compact, 7. Aufl.; 2017).

Typ	Definition	Motorik	Alter	Prognose
I	Infantil	Kein Sitzen	< 6 M	< 3 Jahre
II	Intermittierend	Kein Stehen	< 18 M	Adoleszenz
III	Juvenil	Früh Rollstuhl	< 18 J	Normal
IV	Adult	Spät Rollstuhl	> 18 J	Normal

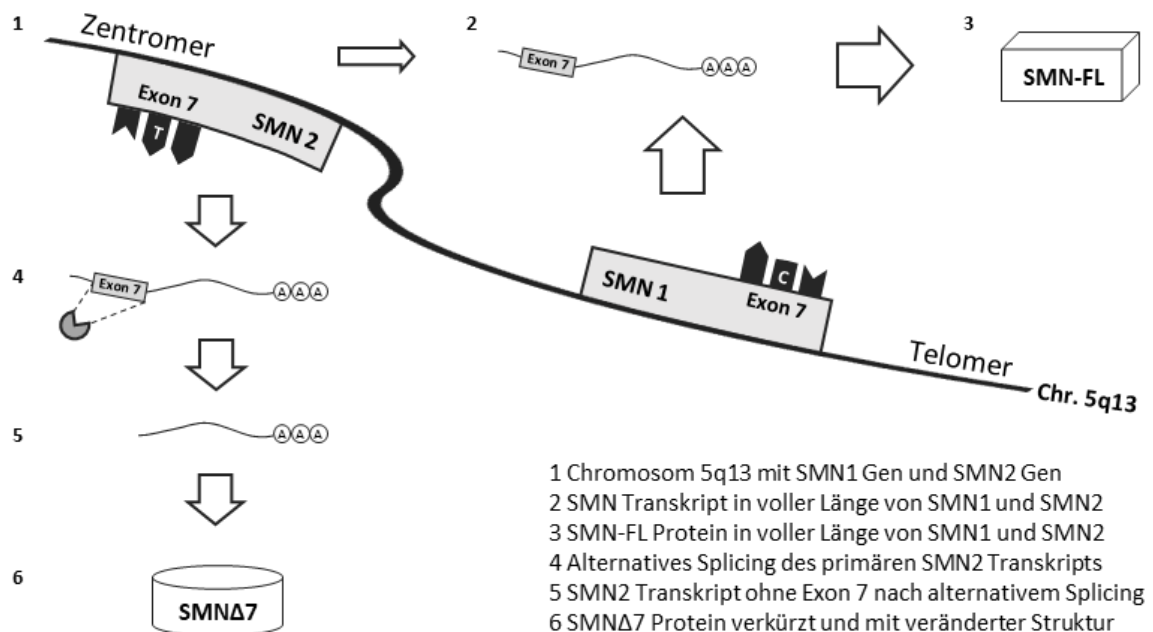
**Tabelle 1: Klassifizierung der proximalen spinalen Muskelatrophie**

### 2.2.2 Genetik

1990 wurde das ursächliche Gen für die proximale spinale Muskelatrophie auf dem langen Arm des Chromosoms 5q11.2-13.3 des menschlichen Genoms identifiziert (Gilliam *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990; Brzustowicz *et al.*, 1990). Auf Chromosom 5q13 befinden sich zwei SMN Gene, das SMN1 Gen in telomerer Region und das SMN2 Gen in zentromerer Region als invertierte Duplikation des SMN1 Gens (Lefebvre *et al.*, 1995). Die DNA-Sequenz der beiden Gene unterscheidet sich an 5 Positionen (Abbildung 3 [1; 2]). Entscheidend ist die Punktmutation auf Exon 7. Hierbei handelt es sich um einen Basentausch von Cytosin (SMN1) zu Tyrosin (SMN2) (Lefebvre *et al.*, 1995). Dieser Basentausch hat zur Folge, dass bei einem Großteil der SMN2 Transkripte Exon 7 durch alternatives Spleißen aus der mRNA abgespalten wird (Abbildung 3 [4]). Fehlt Exon 7, bildet sich ein verkürztes SMN Protein (SMN $\Delta$ 7<sup>1</sup>; Abbildung 3 [6]). (Lefebvre *et al.*, 1995; Gennarelli *et al.*, 1995; Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Das verkürzte SMN $\Delta$ 7 Protein zeigt Veränderungen im C-Terminus. (Gennarelli *et al.*, 1995). Dadurch fehlt die entscheidende Domäne, die es dem Protein ermöglicht, sich selbst zu Oligomeren zusammenzulagern oder an andere Proteine zu binden (Lorson *et al.*, 1998). Die Stabilität des SMN $\Delta$ 7

<sup>1</sup> SMN $\Delta$ 7 = *Survival motoneuron delta 7* (ohne Exon 7)

Proteins wird reduziert und intrazelluläre Abbauprozesse werden beschleunigt (Pellizzoni *et al.*, 1999; Lorson & Androphy, 2000).



**Abbildung 3: SMN: Gene, Transkripte und Proteine im gesunden Organismus**

Unter physiologischen Verhältnissen besitzt ein Mensch zwei SMN Gene, die sich nur durch wenige Punktmutationen unterscheiden. Das telomere SMN Gen (SMN1) bildet ein stabiles und voll funktionsfähiges SMN Protein. Beim zentromeren SMN Gen (SMN2) kommt es über alternatives Spleißing bei einem Großteil der Transkripte zu einem Verlust des Exons 7 und dadurch zu einem verkürzten und instabilen SMN Protein (SMNΔ7). (Eigene Abbildung)

Patienten mit spinaler Muskelatrophie weisen Mutationen im SMN1 Gen oder den fast vollständigen Verlust des SMN1 Gens auf (Cobben *et al.*, 1995; Bussaglia *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996). Liegt also eine Störung oder ein Verlust des SMN1 Gens vor, so ist nur noch der geringe Anteil des SMN2 Transkripts, der sich dem alternativen Spleißing entziehen kann, in der Lage, ein voll funktionsfähiges SMN Protein zu bilden. Diese geringe Menge (10-20%) des voll funktionsfähigen SMN Proteins reicht aber für eine adäquate Entwicklung der Motoneurone nicht aus. In der Folge entsteht die spinale Muskelatrophie. Die unterschiedlichen

Schweregrade der SMA korrelieren dabei direkt mit der Kopienzahl des SMN2 Gens (Lefebvre *et al.*, 1997; Vitali *et al.*, 1999).

### 2.2.3 Tiermodelle

In der Maus wurde ein dem menschlichen SMN Gen zu 82% identisches Gen auf Chromosom 13 identifiziert. Dieses Gen entspricht dem humanen SMN1 Gen und zeigt kein alternatives Splicing. Das murine Gen liegt im Gegensatz zum menschlichen SMN Gen nicht dupliziert, sondern nur einfach vor (Viollet *et al.*, 1997, DiDonato *et al.*, 1997). Wird das murine SMN Gen auf beiden Allelen der Maus inaktiviert, resultiert daraus ein nicht überlebensfähiger Embryo und in der histologischen Aufarbeitung zeigt sich massiver embryonaler Zelltod (Schrank *et al.*, 1997). Daraufhin wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt, das auf Grundlage eines murinen homozygoten *Smn* Knockouts zusätzlich das menschliche SMN2 Gen exprimiert (*Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub>). Die transgenen *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub> Mäuse produzieren durch das zusätzliche menschliche SMN2 Gen geringe Mengen des für das Überleben notwendigen SMN Proteins in voller Länge. Das Überleben der transgenen *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub> Mäuse ist dabei ebenfalls abhängig von der Kopienzahl des SMN2 Gens. Mäuse, die nur eine Kopie des SMN2 Gens enthalten, werden entweder tot geboren oder sterben innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt, während Mäuse mit bereits zwei SMN2-Kopien schon durchschnittlich 6 Tage überleben (Monani *et al.*, 2000). Die Pathologien im Rückenmark und im Skelettmuskel der *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub> Mäuse ähneln dem Bild der menschlichen SMA Typ 1 Erkrankung (Hsieh-Li *et al.*, 2000). Mit dem *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub> Mausmodell wurde die Grundlage für die Entwicklung weiterer Mauslinien geschaffen, die mildere Formen der SMA repräsentieren. Ein Beispiel ist die transgene *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub>;*SMN*<sub>Δ7</sub> Mauslinie. Für diese Mauslinie wurden transgene Mäuse entwickelt, die das SMN2 Protein ohne Exon 7 (*SMN*<sub>Δ7</sub>) exprimieren und mit Mäusen gekreuzt, die genetisch eine schwere Form der SMA aufweisen (Le *et al.*, 2005). Die Menge des *SMN*<sub>Δ7</sub> Proteins steigt so zusätzlich an. Das Überleben der *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sub>tg</sub>;*SMN*<sub>Δ7</sub> Mäuse beträgt im Durchschnitt 13,3 Tage (Le *et al.*, 2005).

### 2.2.4 Pathogenese

Bei der spinalen Muskelatrophie kommt es durch den Verlust des SMN Proteins zur Degeneration der Motoneurone. SMN ist ein Protein mit einer Länge von 294 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 40 kDa, das ubiquitär exprimiert wird und sich sowohl im Zellkern aber hauptsächlich im Zytoplasma befindet (Lefebvre *et al.*, 1995). Für das SMN Protein wurde eine Funktion bei Spleiß-Prozessen der Zelle beschrieben (Liu *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2000). Das SMN Protein lagert sich dabei mit snRNA<sup>2</sup> und Binde-Proteinen zu einem Komplex zusammen, wird in den Zellkern geschleust und bildet dort Oligomere in nukleären Mikrostrukturen (Liu & Dreyfuss, 1996; Paushkin *et al.*, 2002). Reduziert sich die Menge des SMN Proteins oder verändert sich dessen Struktur durch eine Mutation in der DNA (SMNΔ7 Protein), folgt daraus die fehlerhafte Zusammensetzung der SMN Komplexe und es entstehen Defizite beim Spleißen (Pellizzoni *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 2005).

Da es sich beim SMN Protein aber um ein Protein handelt, das in allen Zellen des Körpers vorkommt, stellt sich die Frage, warum bei Verlust des SMN Gens zu Beginn der Erkrankung ausschließlich Motoneurone betroffen sind. Motoneurone unterscheiden sich von anderen Zellen durch ihre komplexe Verbindung zur Muskelfaser. Es existieren demnach Konzepte, die sich neben der Beteiligung beim Spleißen auch auf mögliche Zusatzfunktionen des SMN Proteins speziell in Motoneuronen konzentrieren. Diese Konzepte beschäftigen sich mit Vorgängen während des axonalen Transports oder mit der Verbindung zwischen dem distalen Motoneuron und der Muskelfaser. Da bei SMA Patienten massive Störungen der neuromuskulären Endplatte und somit auch der Neurotransmission vorliegen, wurde der Verdacht geäußert, dass es sich bei der spinalen Muskelatrophie um eine Erkrankung handelt, die vom distalen Motoneuron ausgeht (Pinter *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 1995). Für diese Theorie spricht zum Beispiel, dass die Motoneurone bei der SMA ähnliche Pathologien aufweisen wie Motoneurone nach einer Axotomie, einer extern herbeigeführten traumatischen Unterbrechung des distalen Axons (Crawford & Pardo, 1996). SMA Motoneurone zeigen außerdem eine selektive Reduktion von  $\beta$ -Aktin im

---

<sup>2</sup> snRNA = *small nuclear ribonucleic protein*

Wachstumskegel (Rossoll *et al.*, 2003).  $\beta$ -Aktin zählt zu den Bestandteilen des Zytoskeletts, die für die Ausbildung der neuromuskulären Endplatte verantwortlich sind (Moradi *et al.*, 2017). Bei der SMA handelt es sich also am ehesten um eine Differenzierungsstörung des distalen Axons.

Bei der SMA wurden Defizite bei Motoneuronen im Bereich des distalen Axons und der neuromuskulären Endplatte festgestellt. So konnte gezeigt werden, dass Störungen bei der Clusterbildung bestimmter Kalziumkanäle vorliegen (Jablonka *et al.*, 2007; Tejero *et al.*, 2016). Die SMA Motoneurone zeigen eine Reduktion spontaner Kalziumtransienten, was verdeutlicht, dass die Erregbarkeit der SMA Motoneurone eingeschränkt ist (Jablonka *et al.*, 2007).

### **2.2.5 Behandlungsstrategien**

Anhand der genetischen Grundlage der proximalen SMA wurden verschiedene therapeutische Ansätze entwickelt, die direkt an der DNA ansetzen oder indirekt in den Transkriptionsprozess des SMN Gens eingreifen. Der Vorschlag, das fehlende SMN1 Gen von extern zu ersetzen, wurde mithilfe eines SMN1 Gentransfers über einen AAV Lentivirus realisiert (Azzouz *et al.*, 2004). Der Gentransfer führte in einem SMA Mausmodell bereits zu einem drastischen Anstieg der Lebenserwartung und zu einer vollständigen Wiederherstellung aller motorischen Funktionen (Dominguez *et al.*, 2011). Aktuell befinden sich die Anwendungen eines lentiviralen SMN1 Gentransfers in klinischen Phase-drei Studien (NCT03461289; NCT03505099).

Andere Ansätze verfolgen das Ziel, die Entfernung von Exon 7 aus dem SMN2 Transkript zu verhindern, sodass trotz fehlendem SMN1 Gen mehr SMN Protein in voller Länge produziert wird. Es existieren dazu bereits zelleigene RNA-bindende Proteine, die das alternative Spleißen hemmen oder aktivieren. Die Proteine binden an spezifische *splicing enhancer* oder *splicing silencer* Sequenzen auf der mRNA. Diese spezifischen Sequenzen auf der mRNA lassen sich durch Antisense-Oligonukleotide (ASO) blockieren. Es wurde eine *splicing silencer* Sequenz im SMN2 Transkript (ISS-N1) entdeckt, die dazu beiträgt, dass Exon 7 aus dem SMN2 Transkript abgespalten wird (Singh *et al.*, 2006). Wird diese ISS-N1 von einem entsprechenden Antisense-Oligonukleotid blockiert,



können die RNA-bindenden Proteine nicht mehr an die ISS-N1 Sequenz binden und Exon 7 aus der mRNA schneiden. Exon 7 bleibt somit im SMN2 Transkript erhalten und es bildet sich das SMN Protein in voller Länge (Hua *et al.*, 2008; Hua & Krainer, 2012). Diese Entdeckung war die Grundlage für die Entwicklung des Wirkstoffs Nusinersen (Spinraza®), der seit 2016 für die Therapie der spinalen Muskelatrophie auf dem Markt zugelassen ist. Die Behandlung mit ASOs zeigt nicht nur eine vollständige Wiederherstellung der SMN Proteinmenge in der Zellkultur, sondern führt sowohl im Mausmodell als auch in klinischen Studien zu einem deutlichen Rückgang der Symptomatik und zu einer Verbesserung der Gesamtprognose (Porensky *et al.*, 2012; Finkel *et al.*, 2017).

### **2.2.6 SMARD1 als Sonderform**

Die SMARD1<sup>3</sup> oder distale spinale Muskelatrophie 1 (DSMA1) wird ebenfalls zu den spinalen Muskelatrophien gezählt, zeigt im Vergleich zur proximalen SMA jedoch Unterschiede in Genetik und klinischem Bild. Frühsymptome sind eine intrauterine Wachstumsstörung, ein niedriges Geburtsgewicht und Deformitäten der Füße (Grohmann *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003). Bereits wenige Monate nach der Geburt entwickelt sich eine progressive Muskelschwäche mit ausgeprägter Beteiligung des Zwerchfells, was eine Langzeitbeatmung erforderlich macht (Eckart *et al.*, 2012). Im Gegensatz zur proximalen SMA sind die Paresen überwiegend distal und an der unteren Extremität (Kaindl *et al.*, 2008).

Der SMARD1, als eigenständige Form der spinalen Muskelatrophien, liegt eine Mutation im IGHMBP2 Gen zugrunde, welches für eine Helikase kodiert (Cox *et al.*, 1998; Grohmann *et al.*, 2001). Obwohl die klinische Erscheinung bei der SMARD1 Erkrankung ausgeprägter ist als bei der proximalen SMA (siehe Kapitel 1.2.1), zeigen die Motoneurone aus dem SMARD1 Mausmodell (Nmd<sup>2J</sup>) *in vitro* deutlich weniger Auffälligkeiten (Grohmann *et al.*, 2004; Surrey *et al.*, 2018). Histologisch konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation im IGHMBP2 Gen zu geschwollenen Axonen und zu einer abnormalen Struktur der neuromuskulären Endplatten führt (Diers *et al.*, 2005). In einer weiteren Arbeit wurde indes beobachtet, dass die Degeneration der Motoneurone zwar ein

---

<sup>3</sup> SMARD1 = *spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1*

frühes Event in der Pathogenese der SMARD1 Erkrankung darstellt, dass jedoch die neuromuskulären Endplatten an diesem Vorgang nicht unmittelbar beteiligt sind (Krieger *et al.*, 2013).

### 3. Zielsetzung

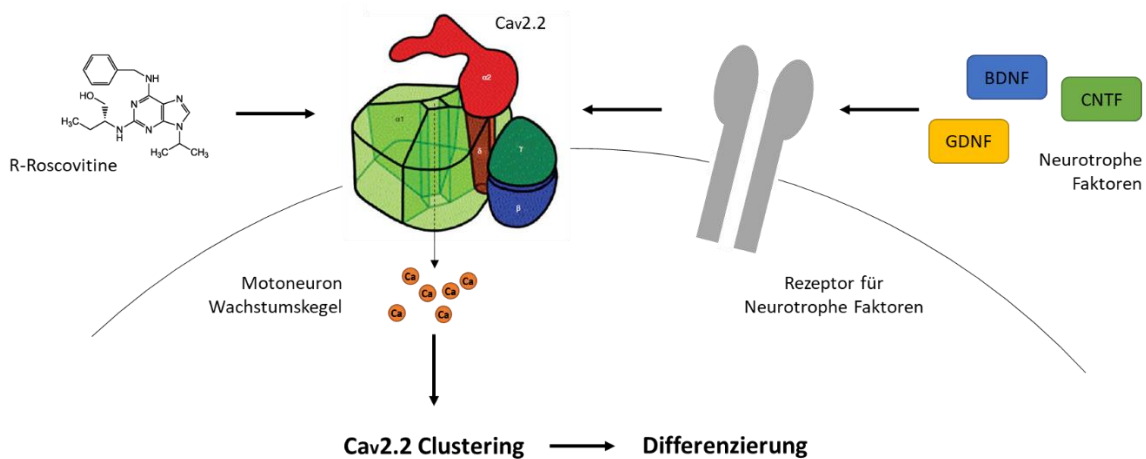
Der Differenzierungsdefekt an der neuromuskulären Endplatte gilt als eine Ursache für die zelluläre Degeneration der Motoneurone bei der spinalen Muskelatrophie (Rossoll *et al.*, 2003; Jablonka *et al.*, 2007, Riuz *et al.*, 2010; Torres-Benito *et al.*, 2011; Riuz & Tabares, 2014; ). Eine der wichtigsten Ansatzpunkte für diesen Differenzierungsdefekt sind die N-Typ ( $Ca_v2.2$ ) und PQ-Typ ( $Ca_v2.1$ ) spannungsabhängigen Kalziumkanäle im Wachstumskegel und im präsynaptischen Bereich der Endplatte der SMA Motoneurone. Von diesen Kalziumkanälen scheint insbesondere der N-Typ ( $Ca_v2.2$ ) Kanal auch für die Embryonalentwicklung von Bedeutung zu sein (Westenbroek *et al.*, 1998). Die folgenden Teile dieser Doktorarbeit beschäftigen sich zum einen mit der Modulation des N-Typ Kalziumkanals und die Auswirkung auf spontane Kalziumtransienten und die Differenzierung von Smn-defizienten primär kultivierten Motoneuronen. Zur Modulation der Kalziumkanäle wurde die Substanz R-Roscovitine verwendet, die an die Kalziumkanäle bindet und deren Öffnungszustände moduliert, indem es die Deaktivierung und damit die Schließung der Kanäle verlangsamt. Weiterhin soll untersucht werden, ob neurotrophe Faktor ebenfalls einen Einfluss auf spontane Kalziumtransienten in primären Motoneuronen haben. Als letzter Punkt wurde adressiert, ob primäre Motoneurone eines Mausmodells für spinale Muskelatrophie mit Ateminsuffizienz (SMARD1) ähnlich den SMA Motoneuronen einen Defekt der spontanen Kalziumeinströme zeigen.

Es ergibt sich somit folgende Hypothese: Die Gabe des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine verbessert das Differenzierungsverhalten der SMA Motoneurone, indem es den Kalziumeinstrom am Wachstumskegel der SMA Motoneurone verbessert. Die Parameter, die im Rahmen dieser Hypothese betrachtet werden, beziehen sich sowohl auf morphologische Aspekte (Axonlänge) als auch auf funktionelle Eigenschaften der Motoneurone (spontane Kalziumtransienten). Des Weiteren wird thematisiert, durch welchen zellulären Mechanismus der Effekt von R-Roscovitine zustande kommt. Um zu unterscheiden, welcher Angriffsort von R-Roscovitine für die Verbesserung der Motoneuronentwicklung verantwortlich ist,

werden zusätzlich Substanzen getestet, die ausschließlich eine Wirkung am  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal oder an Cdk5 aufweisen. Hierzu zählen der Cdk5 Inhibitor S-Roscovitine, der  $\text{Ca}_v2.2$  Agonist GV-58 und der spezifische  $\text{Ca}_v2.2$  Antagonist  $\omega$ -Conotoxin.

Die Entwicklung der Motoneurone wird durch die neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF gefördert. Dabei ist jedoch unklar, über welche Mechanismen die neurotrophen Faktoren am Wachstumskegel zur Differenzierung beitragen. In den folgenden Versuchen soll deshalb die Frage beantwortet werden, ob und in welchem Ausmaß die neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF einen Einfluss auf die spontanen Kalziumeinströme während der Differenzierung der Motoneurone haben.

Im letzten Teil meiner Doktorarbeit habe ich untersucht, ob bei primären Motoneuronen aus einem SMARD1 Mausmodell ebenfalls eine reduzierte Frequenz von Kalziumtransienten vorliegt, vergleichbar den SMA Motoneuronen. Die Erkenntnisse dieser Untersuchungen könnten Rückschlüsse über die generellen Krankheitsmechanismen bei spinalen Muskelatrophien geben.



#### Abbildung 4: Schematisches Modell des Motoneuron Wachstumskegels

Dargestellt ist ein Abschnitt der Zellmembran eines Motoneuron-Wachstumskegels. R-Roscovitine bindet direkt an den  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal, wodurch der Kanal länger im geöffneten Zustand bleibt, was die Differenzierung der Motoneurone verbessert. Der  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal kann aber auch indirekt über neurotrophe Faktoren beeinflusst werden. (Bildquelle des Kalziumkanals aus Catterall et al., 2011)

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Tiere

C57Bl/6 Mauslinie

Charles River Animal  
Facility

CD-1 Mauslinie

Charles River Animal  
Facility

*Cdk5*<sup>-/-</sup> Mauslinie

Jackson Laboratories

*Nmda*<sup>ΔJ</sup> Mauslinie

Jackson Laboratories

*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sub>tg</sub> Mauslinie

Jackson Laboratories

*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sub>tg</sub>; *SMNΔ7* Mauslinie

Jackson Laboratories

*trkBTK*<sup>-/-</sup> Mauslinie

Jackson Laboratories

#### 4.1.2 Chemikalien und Zusätze

Agarose

Biozym

Ammoniumpersulfat (APS)

Thermo Fisher Scientific

*Aqua bidestillata* (Aqua bidest.)

DeltaSelect

B-27-Supplement (50x)

Thermo Fisher Scientific

Betaine (5 M)

Sigma-Aldrich

Borsäure

AppliChem

Bovines Serumalbumin (BSA)

Sigma-Aldrich

*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)

Chemicon Europe

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich

Chelex

Biorad

Chlorwasserstoffsäure (HCl)

Merck

*Ciliary neurotrophic factor* (CNTF)

Institut für klinische  
Neurobiologie, Universität  
Würzburg

Ω-Conotoxin (CTX)

Biotrend

dATP, dTTP, dCTP, dGTP (dNTPs 10 mM)

MBI Fermentas

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Thermo Fisher Scientific

Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Merck

DNA-Marker (100 bp)

Fermentas

*Donkey Serum* (DS)

EMD Millipore

Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (GDNF)	Promega
Glucose	Merck
GlutaMAX™-I (500 µM)	Thermo Fisher Scientific
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
GV-58	Adipogen ManRos
	Reagents
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
<i>Horse serum</i> (hitzeinaktiviertes Pferdeserum)	Linaris
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX™-I)	Thermo Fisher Scientific
Laminin-111 ( <i>Purified human Laminin</i> )	Thermo Fisher Scientific
Laminin-221/211 ( <i>Purified human Merosin</i> )	EMD Millipore
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mowiol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck
Neurobasal (NB)	Thermo Fisher Scientific
<i>Oregon Green 488 BAPTA-1, AM-Ester</i> (OGB)	Thermo Fisher Scientific
P75 <sup>NTR</sup> Antikörper (p75)	Biosensis
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Thermo Fisher Scientific
Pluronic F-27	Thermo Fisher Scientific

Polyacrylamid (40%)	Biorad
Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid (Polyornithin)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylene-sorbitane-monolaurate (Tween-20)	Sigma-Aldrich
Primer (100 pmol/μl)	Metabion
Protein-Marker	Fermentas
R-Roscovitine	Calbiochem
Sacrosyl	Sigma-Aldrich
S-Roscovitine	Calbiochem
<i>Standard Taq Reaction Buffer (10x)</i>	5' Prime
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
TritonX-100 (0,3%)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Worthington
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich
<i>Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

#### 4.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Agarosegel (2%)	2 g Agarose-Pulver in 100 ml TAE (1x)
Blocking-Lösung (Immunzytochemie)	1 ml BSA (2%), 500 μl DS (10%), 3500 μl TBS-T (1x)
Blocking-Lösung (Western Blot)	2,5 g Milchpulver (5%), 50 ml TBS-T (1x)
Borat-Puffer (0,15 M)	9,27 g Borsäure, 1 l Aqua bidest., pH 8,35
Calcium Imaging Puffer	NaCl (135 mM), MgCl <sub>2</sub> (1 mM), HEPES (10 mM), CaCl <sub>2</sub> (1 mM), KCl (6 mM), Glucose (5,5 mM)
Ω-Conotoxin (0,3 mM)	0,5 mg ω-Conotoxin, 631,5 μl HBSS
Depolarisationslösung	1,1184 g KCl (30 mM), 4 g NaCl (0,8 %), 500 ml Aqua bidest.
Elektrophoresepuffer (10x)	30,3 g TRIS, 144 g Glycin, 10 g SDS, 1 l Aqua bidest.
GV-58 (10 mM)	1 mg GV-58, 267 μl DMSO
HEPES-Lösung (1M)	23,83 g HEPES (1 M), 100 ml Aqua bidest.
Ladepuffer (6x)	Glycerin (30%), Xylencyanol (0,25%), Bromphenolblau (0,25%), TAE (1x)

Lämmli-Puffer (2x)	4,8 ml TRIS-HCl (1 M), 4,8 ml Mercaptoethanol, 2 g SDS, 10 ml Glycerin, 40 mg Bromphenolblau
Laminin Lösung	Laminin-221/211 (2,5 µg/ml), HBSS
Lyse-Puffer	2,5 ml Sacrosyl (10%), 1 ml NaCl (5 M), 2,5 g Chelex (5%), 50 ml Aqua bidest.
Motoneuron-Medium (MN)	1 ml Horse-Serum (2%), 1 ml B27-Supplement (1:50), 48 ml Neurobasal
Mowiol-Lösung	10 g Mowiol, 40 ml PBS, 20 ml Glycerin pH 8,0
Neurobasal-Lösung (NB)	495 ml Neurobasal, 5 ml GlutaMAX™-I (500 µM)
OGB-Lösung (5 mM)	50 µg OGB, 8,9 µl Pluronic F-27/DMSO (20%), Ultraschall-Wasserbad (3min)
P75 <sup>NTR</sup> Antikörper-Lösung	p75 <sup>NTR</sup> -Antikörper (1:2000), Tris-Puffer (10 mM)
PFA-Lösung (4%)	40 g PFA, 410 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /2H <sub>2</sub> O, 90 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /2H <sub>2</sub> O, 500 ml Aqua bidest.
Pluronic F-27/DMSO (20%)	20 mg Pluronic F-27, 100 µl DMSO, Thermomixer (37°C)
PORN-H (1x)	500 µl Polyornithin (100 x), 50 ml Borat-Puffer (0,15 M)
R-Roscovitine (10 mM)	1 mg R-Roscovitine in 250 µl DMSO
Sammelgelpuffer	TRIS (0,5 M), SDS (0,4%) pH 6,8
S-Roscovitine (10 mM)	1 mg S-Roscovitine in 250 µl DMSO
TAE (50x)	484 g TRIS (2 M), 114,2 ml Essigsäure (1 M), 200 ml EDTA (0,5 M), 4 l Aqua bidest., pH 8,0
TBS-T (10x)	2,42 g TRIS (200 mM, pH 8), 8 g NaCl, 0,5 ml Tween-20 (1%), pH 7,6
Transferpuffer (Towbin)	100 ml Elektrophoresepuffer (10x), 200 ml Methanol, 700 ml Aqua bidest.
Trenngelpuffer	TRIS (1,5 M), SDS (0,4%) pH 8,8
Tris-Puffer (10 mM)	1 g TRIS-Pulver, 825 ml Aqua bidest., pH 9,5



Trypsin-Inhibitor-Lösung (1%)	500 mg Trypsin-Inhibitor, 1 ml HEPES (1M), 49 ml HBSS, pH 7,3
Trypsin-Lösung (1%)	2 g Trypsin-Pulver, 5 ml HEPES (1M), 200 ml HBSS, pH 7,3

#### 4.1.4 Enzyme

Proteinase K (20 mg/ml)	Roche
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	5' Prime

#### 4.1.5 Primer

Sense SMN 201f	5' – CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CCT G – 3'
Antisense SMN wt	5' – AAT CAA TCT ATC ACC TGT TTC AAG GGA GTT G – 3'
Antisense SMN ko	5' – GAT GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT G – 3'

#### 4.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Typ	Herkunft	Referenz
β-Aktin	1:500	Monoklonal	Maus	GeneTex
Calnexin	1:1000	Polyklonal	Gans	Sicgen
Cdk5	1:500	Monoklonal	Maus	Thermo Fisher Scientific
N-Typ Cav2.2 α1b-Untereinheit	1:500	Polyklonal	Meerschweinchen	Synaptic Systems
P75 <sup>NTR</sup>	1:10000	Polyklonal	Maus	BD Biosensis
SMN	1:5000	Monoklonal	Maus	BD Biosensis
Tau	1:1000	Polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich
TrkB	1:1000	Polyklonal	Kaninchen	EMD Millipore

**Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper**

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezifität	Herkunft	Referenz
Alexa Fluor 488	1:400	Anti-Maus	Esel	Thermo Fisher Scientific
Cy2-knjugiert	1:400	Anti-Meerschweinchen	Esel	Jackson Immunoresearch
Cy3-knjugiert	1:600	Anti-Kaninchen	Esel	Jackson Immunoresearch
Cy5-knjugiert	1:500	Anti-Kaninchen	Esel	Dianova
Horseradish-Peroxidase	1:10.000	Anti-Maus	Gans	Dianova
Horseradish-Peroxidase	1:10.000	Anti-Maus	Esel	Dianova

**Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper**

#### 4.1.7 Technische Geräte

Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer (Agarose)	PeqLab
Elektrophoresekammer (SDS)	Bio-Rad
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme (Curix 60)	AGFA
Inkubator	Binder
Floureszenzmikroskop Kamera IMAGO	TILL Photonics
Floureszenzmikroskop Messstation Polychrom II	TILL Photonics
Konfokales Mikroskop (BX51WI)	Olympus
Konfokales Mikroskop (TCS SP2 und SP5)	Leica TCS
LED Lichtquelle für <i>Calcium Imaging</i>	Visitron Systems
Lichtmikroskop DMLB mit DFC 420 Digitalkamera	Leica
Lichtmikroskop Primovert M60-2-0064	Zeiss
NanoDrop Spektrometer 1000	PegLab
Objektiv (40x LUMPlanFI/IR, 0,8 W)	Olympus
pH-Meter (pH211)	Hanna Instruments
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
Präzisionswaage EW 2200	Kern und Sohn GmbH
Präzisionswaage SAE 200	Bosch
Rolera-XR Camera	Qimaging
Stromgerät für Agarose-Gelelektrophorese (PowerPac HC)	Bio-Rad
Stromgerät für SDS-Gelelektrophorese (Power Pack P25 T)	Biometra
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall Wasserbad	Bandelin
UV-Transluminator für Agarosegel	Intas
Vortex Mixer GLW L46	Hartenstein
Wasserbad	Memmert
Western-Blot Transfersystem	Bio-Rad
Zählkammer	Neubauer
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge fresco	Thermo Scientific
Zentrifuge MC 6400	Hartenstein

#### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth
Blotting-Papier	Bio-Rad
Deckgläschen	Hartenstein
Handschuhe	SensiCare Ice
Glaspipetten (10 ml; 5 ml)	Hartenstein
Objektträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck
Parafilm	Sarstedt
Pipettenspitzen (1000 µl; 200 µl; 10 µl)	Sarstedt
Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten, Skalpell)	Dumont
PVDF-Membran	Biorad
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße für PCR	Sarstedt
Röntgenfilm (13x18 cm Fujifilm Super RX)	Röntgen Bender
Terralin Desinfektion	Schülke
Zellkulturschalen (1-, 4-, 6-, 12-, 24-Well)	Greiner Bio-one
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-one

#### 4.1.9 Software

Office 2016 Excel, Power Point, Word	Microsoft
GraphPad Prism 5.0	San Diego, CA
ImageJ	WS Rasband, US
Leica LAS-AF lite	Leica
StreamPix	Norpix

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mausmodelle

Die Haltung der Tiere erfolgte in der zentralen Tierzuchteinrichtung des Instituts für Klinische Neurobiologie in Würzburg unter kontrollierten Bedingungen (Wasser- und Nahrungszufuhr, Temperatur 20-22°C, Luftfeuchtigkeit 55-65%, Hell/Dunkel-Zyklus 12:12 Stunden) nach den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und der *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC)* mit

Genehmigung des Veterinäramts der Stadt Würzburg und der Ethikkommission für Tierversuche der Regierung von Unterfranken.

### Wildtypische Mauslinien

Für Versuche in Zusammenhang mit spinaler Muskelatrophie wurde das wildtypische CD-1 Mausmodell gewählt. Hier besteht eine genetische Ähnlichkeit zu dem FVB/NJ-Modell, das den Hintergrund für die SMA Mauslinien darstellt. Für SMA-unabhängige Experimente wurde das wildtypische Mausmodell C57BL/6 verwendet.

### SMA Mauslinien

Für die Experimente an primären Maus-Motoneuronen wurden embryonale Zellen aus dem transgenen *Smn<sup>-/-</sup>;SMN2<sub>tg</sub>* Mausmodell verwendet (Monani *et al.*, 2000). Für die in der Diskussion genannten Medikamententests im Tierversuch wurde das *Smn<sup>-/-</sup>;SMN2<sub>tg</sub>;SMN $\Delta$ 7* Mausmodell verwendet (Le *et al.*, 2005; Grundlagen siehe 2.2.3 Tiermodelle).

### Cdk5 Mauslinie

Die B6;129-*Cdk5<sup>tm1Kul</sup>/J* (*Cdk5<sup>-/-</sup>*) Mauslinie auf einem C57BL/6 Hintergrund weist einen vollständigen Knockout der Zyklin-abhängigen Kinase 5 (*Cdk5*) auf. Homozygote Tiere haben eine hohe perinatale Mortalität. Der Anteil homozygoter *Cdk5<sup>-/-</sup>* Tiere beträgt 9-19% pro Wurf bei heterozygoter Verpaarung. Lebend geborene *Cdk5<sup>-/-</sup>* Mäuse versterben innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt und zeigen eine gestörte laminäre Struktur des Kortex und eine pathologische neuronale Vakuolenbildung (Ohshima *et al.*, 1996).

### TrkB Mauslinie

Die *trkBTK<sup>-/-</sup>* (*TrkB<sup>-/-</sup>*) Mauslinie auf C57BL/6 Hintergrund trägt eine Mutation im Abschnitt des *TrkB* Gens, der für die katalytische Domäne der Tyrosinkinase (gp14trkB) kodiert. Durch diese Mutation sind die Signalwege für BDNF und NT-4 gestört. Homozygote Tiere zeigen zentrale und periphere neurologische Ausfälle und versterben innerhalb eines Tages (Klein *et al.*, 1993).

### Nmd<sup>2J</sup> Mauslinie

Mäuse, die eine *Nmd<sup>2J</sup>* Mutation (Mauslinie B6.BKS-*Ighmbp2nmd-2J/+* auf C57BL/6 Hintergrund) tragen, entwickeln eine voranschreitende Lähmung des gesamten Körpers mit Beginn an den hinteren Gliedmaßen. Es kommt zu Kontrakturen und starken Bewegungseinschränkungen. Das Gesamtüberleben der homozygoten Tiere ist im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt (Cook *et al.*, 1995).

### **3.2.2 Primäre embryonale Motoneuronen-Zellkultur**

Die zelluläre Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war die primäre Motoneuronenkultur aus individuellen Mausembryonen. Isolation, Anreicherung und *in vitro* Kultivierung primärer Motoneuronen basierte auf der Methode nach Wiese *et al.*, 2010.

### Präparation

Alle Experimente wurden mit Embryonal-Tag 12.5 (E12.5) trächtigen Mäusen durchgeführt. Das Töten der adulten Muttertiere wurde mit Hilfe einer zervikalen Dislokation durchgeführt, die Embryonen wurden aus dem Uterus des Muttertiers entnommen und von der jeweiligen Placenta abgelöst. Nach Abtrennung des Kopfes und des Schwanzes für die spätere Bestimmung des Genotyps wurde der Embryo in Bauchlage gedreht. Im Anschluss wurde die Haut an beiden Seiten entlang des Spinalkanals abgetragen und der lumbale Teil des Rückenmarkes herauspräpariert. Darauf folgte die Entfernung der Meningen und der Hinterwurzelganglien. Das Rückenmarksgewebe wurde mit 0,025%-igen Trypsin in HBSS für 10 min bei 37°C inkubiert und der eingeleitete Gewebeverdau mittels Zugabe von 0,1%-igem Trypsin-Inhibitor gestoppt. Blasenfreies Triturieren führte anschließend zur Dissoziation des Gewebes und somit zur Gewinnung einer Einzelzell-Suspension.

### Anreicherung

Unter der Sterilbank erfolgte nun die Anreicherung der Motoneurone aus dem präparierten Rückenmark über ein p75<sup>NTR</sup> Antikörper-Panning. Der p75<sup>NTR</sup> Antikörper bindet an den p75<sup>NTR</sup> Rezeptor, einen niedrig-affinen Rezeptor für

Neurotrophine, der sich zu diesem Entwicklungszeitraum vor allem auf der Oberfläche von Motoneuronen befindet (Wiese et al., 1999; siehe 2.1.4 Neurotrophe Faktoren). Die Einzelzell-Suspensionen der Embryonen wurden jeweils in eine mit p75<sup>NTR</sup> Antikörper-beschichteten Zellkulturschale überführt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) erschütterungsfrei inkubiert. Im Anschluss erfolgte durch einen dreimaligen Waschvorgang mit Neurobasal-Lösung die Entfernung aller Zellen, die nicht an den Antikörper gebunden hatten. Eine Depolarisationslösung löste anschließend wieder die Bindung zwischen den Motoneuronen und dem p75<sup>NTR</sup> Antikörper.

#### In vitro Kultivierung der Motoneurone

Die durch das p75<sup>NTR</sup> Antikörper Panning angereicherten Motoneurone wurden im nächsten Schritt in Motoneuronmedium überführt, zentrifugiert und in der Neubauerzählkammer ausgezählt. Es wurden 2000-3000 Zellen pro cm<sup>2</sup> auf vorher beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Abhängig von den geplanten Experimenten erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 (DIV5) oder 7 Tage (DIV7) in Motoneuronmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Falls nicht anders angegeben, wurden die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF jeweils in Konzentrationen von 10 ng/ml zu den Motoneuronenkulturen gegeben. Ein Mediumswechsel erfolgte alle zwei Tage.

#### Beschichtungen

Als erster Schritt wurden die Deckgläschen oder die Zellkulturschalen mit 5 mg/ml Poly-D/L-Ornithine Hydromid (Porn-H) gelöst in Boratpuffer für 60 min bei RT beschichtet und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Eine weitere Beschichtung mit 2,5 µg/ml Laminin-111 oder Laminin-221/211 gelöst in HBSS erfolgte für 30 min bei RT. Vor der Überführung der Motoneurone auf die beschichteten Deckgläschen wurde die Laminin-Lösung wieder vorsichtig durch Absaugen entfernt.

### 4.2.3 Genotypisierung

#### Gewinnung der DNA

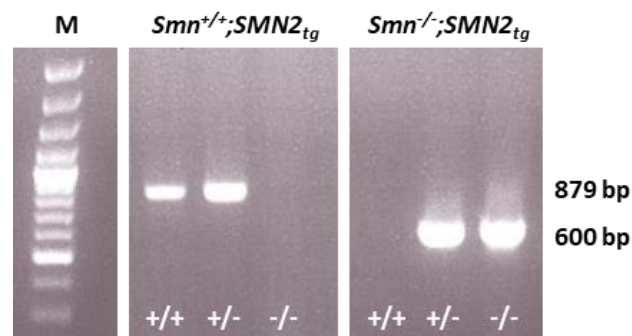
Zur Genotypen-Bestimmung der präparierten Embryonen wurden die entnommenen Gewebebiopsien mit 20 mg/ml Proteinase K in Lyse-Puffer für mindestens 30 min bei 55°C im Thermomixer verdaut und im Anschluss für 8 min bei 99°C aufgeköcht, um den Enzymverdau abzustoppen. Durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurden die Zellüberreste von der flüssigen Phase, in der sich die DNA befand, getrennt. Es erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem NanoDrop Spektrometer.

#### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Pro Embryo wurde ein Ansatz für die PCR des SMA Wildtyps ( $Smn^{+/+}, SMN2_{tg}$ ) und ein Ansatz für die PCR der SMA Mutante ( $Smn^{-/}, SMN2_{tg}$ ) vorbereitet. Beide Ansätze enthalten den *sense primer* (SMN 201f), aber unterschiedliche *antisense primer* jeweils in Konzentrationen von 100 nmol/µl. Den PCR Ansätzen wurden 10-facher PCR-Puffer (1:10) und 10 mM dNTPs (1:50) hinzugefügt. Fünf molares Betain wurde zusätzlich zum Ansatz der SMA Wildtyp gegeben und beide Ansätze wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Es erfolgte die Zugabe der DNA in einem Verhältnis von 1:50. Unmittelbar vor Beginn der PCR wurde die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase (5U/µl) hinzugefügt. Der Ansatz wurde im Vortex gemischt und anschließend abzentrifugiert, in den PCR-Cycler gegeben und das Programm für die Durchführung der PCR gestartet. Im ersten Schritt der PCR wurde die als Doppelstrang vorliegende DNA für 3 Minuten bei 94°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Während der anschließenden Abkühlung auf 57°C waren die Primer nun in der Lage an den Einzelstrang zu binden (Annealing). Im nächsten Schritt lagerte sich bei 72°C die Taq-DNA-Polymerase an den ersten Primer an und vervollständigte den DNA Einzelstrang bis zum Erreichen des zweiten Primers wieder zu einem Doppelstrang (Elongation). Es folgten 30 Zyklen Denaturierung (30 sec), Annealing (30 sec) und Elongation (90 sec), was die identische Vervielfältigung der durch die Primer flankierten DNA-Stücke ermöglichte. Den DNA Proben wurde ein farbiger Ladepuffer (6x) für die anschließende Elektrophorese beigefügt.

## Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Hierfür wurde ein 2%-iges Agarosegel, in TAE-Puffer gelöst und mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid versetzt, hergestellt. Im Anschluss wurden die DNA Proben in jeweils eine Geltasche beladen. Die Auftrennung erfolgte mittels Gleichstrom bei 100 V für 30 min unter Sichtkontrolle des farbigen Laufpuffers. Die Identifikation der DNA Fragmente wurde mit Hilfe eines DNA-Markers durchgeführt. Unter einem UV-Licht Generator wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf dem Agarosegel sichtbar. Bei der PCR des SMA Wildtyps zeigte sich eine Bande bei 879 Basenpaaren (bp), bei der PCR der homozygoten SMA Mutante zeigte sich eine Bande bei 600 bp. Ein Embryo mit heterozygotem Genotyp zeigte sowohl eine Bande in der wildtypischen PCR bei 879 bp als auch eine Bande in der PCR der SMA Mutante bei 600 bp.



### **Abbildung 5: Genotypisierung des SMA Mausmodells**

Amplifizierte DNA-Fragmente werden in einer Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Links: DNA Marker (M), Mitte: PCR des SMA Wildtyps (*Smn*<sup>+/+</sup>,*SMN2*<sub>tg</sub>) mit einer Bande bei 879 bp, Rechts: PCR der SMA Mutante (*Smn*<sup>-/-</sup>,*SMN2*<sub>tg</sub>) mit einer Bande bei 600 bp.

### **4.2.4 Überlebensanalyse primärer Motoneurone**

Um das Überleben der primären Motoneurone zu bestimmen, wurde die durchschnittliche Zahl der Motoneurone an Tag 1, 4 und 7 in einem Zählraster aus vier zufällig gewählten Gesichtsfeldern ermittelt. Die Zellzahl an Tag 1 wurde mit 100% festgelegt.



#### **4.2.5 Immunzytochemie primärer Motoneurone**

Die Durchführung der Immunzytochemie primärer Motoneurone orientierte sich an Rossoll *et al.*, 2003. Nach DIV5 oder DIV7 Zellkultur wurden die Motoneuronen mit vorgewärmten PBS gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit PFA (4%) fixiert. Im Anschluss wurde das PFA entfernt und durch PBS ersetzt. Wurde als Primärantikörper  $\beta$ -Aktin verwendet, folgte nun eine zusätzliche Behandlung mit TritonX-100 (0,3%) für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur, woran sich 3-maliges Waschen mit TBS-T anschloss. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden für eine Stunde mit Blocking-Lösung behandelt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Zellen mit den primären Antikörpern in 1%-iger BSA-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert (Tabelle 2 siehe 4.1.6). Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläschen dreimalig mit TBS-T gewaschen. Es folgte die lichtgeschützte, einstündige Inkubation mit den Sekundärantikörpern in 1%-iger BSA-Lösung (Tabelle 3 siehe 4.1.6). Nach 3 weiteren Waschvorgängen mit TBS-T wurden die Deckgläschen mit erwärmten Mowiol auf Objektträgern fixiert. Die gebundenen Antikörperkomplexe auf den Oberflächenstrukturen der Motoneurone wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Die Signalintensität wurde als *quantal level per pixel* (QL) definiert und mit Hilfe der Leica Software ausgewertet.

#### **4.2.6 Morphologische Zielgrößen**

Morphologische Parameter dienen der Einschätzung des Entwicklungszustands eines Motoneurons. Es wurde die Axonlänge des Motoneurons als Parameter ausgewählt. Für die Ermittlung der Axonlängen wurden die Motoneuronen für 7 Tage kultiviert, mit PFA (4%) fixiert und im Anschluss immunzytochemisch gegen das Zytoskelett-Protein Tau angefärbt und unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Als Mess- und Auswertungsprogramm diente die Software ImageJ.

## 4.2.7 Calcium Imaging

### Grundlagen

Um den Kalziumstrom über der Zellmembran zu messen, wurde der Kalziumindikator Oregon Green (OG) verwendet. In seiner ursprünglichen Form liegt OG als lipophiler, Kalzium-insensitiver Acetoxylester (AM-Ester) vor. Die lipophile Eigenschaft ermöglicht der Substanz den Durchtritt durch die Zellmembran. In der Zelle spalten Esterasen den AM-Ester des OGs ab. Das OG wird dadurch hydrophil und in der Zelle festgehalten. Nach Abspaltung des AM-Esters ist das OG in der Lage, Kalziumionen zu binden und Fluoreszenzlicht bei 520 nm zu emittieren. Kommt es zu einer simultanen Öffnung von Kalziumkanälen, zeigt der OG/Kalzium Komplex eine Fluoreszenzänderung an der Zellmembran an (Grienberger & Konnerth, 2012). Mithilfe dieser Technik wurden die Kalziumströme an den Wachstumskegeln der Motoneurone bestimmt.

### Vorbereitung

Etwa 3000 Motoneurone wurden pro Bedingung auf Deckgläschen mit PORN-H und Laminin-221/211 Beschichtung für 5 Tage in Motoneuronenmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Herstellung des Indikators Oregon Green 488 BAPTA-1 (OGB) wurde OGB mit einer 20%-igen Pluronic F-27 / DMSO Lösung versetzt und anschließend 2 Minuten in einem Ultraschallbad homogenisiert. Unter Licht- und Feuchtigkeitsschutz erfolgte die Lagerung der OGB-Lösung in 0,5 µl Aliquots bei -20°C. Vor Beginn der Messungen wurden die Zellen in OGB-Lösung und Calcium Imaging Puffer im Verhältnis von 1:1000 für 13 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Durchführung

Die Deckgläschen wurden anschließend in eine mit 2 ml *Calcium Imaging* Puffer gefüllte, beheizte Zellkulturschale (37°C) überführt. Die Durchführung der Messung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop unter der Verwendung eines 40er Objektivs. Eine Kamera erzeugte mit einer Frequenz von 2,5 Hz via *Time-Lapse-Imaging* Einzelbildaufnahmen (Expositionszeit: 400 ms; Binning 2), die in

Echtzeit unter der *StreamPix software* angezeigt werden konnten. Eine LED Lichtquelle bestrahlte die Zellen kontinuierlich mit 470 nm. Die Filtereinstellungen waren: Exzitation  $482 \pm 35$  nm, dichroitischer Filter 506 nm, Emissionsfilter  $536 \pm 40$  nm. Für die Aufnahmen nach Langzeit-Exposition wurden pro Messung 500, für die Puls-Experimente pro Messung 1000 Einzelaufnahmen (*Frames*) gewählt.

### BDNF Puls-Applikation

Die Motoneurone wurden 4 Tage mit BDNF (1 ng/ml) und CNTF (1 ng/ml) behandelt und anschließend gründlich mit Neurobasal gewaschen. Darauf folgte eine 24-stündige Phase ohne BDNF (Motoneuronenmedium mit 1 ng/ml CNTF). Für einen Direkt-Vergleich wurde zunächst ein ausgewählter Mikroskop-Ausschnitt mit Motoneuronwachstumskegeln ohne Behandlung für 4 Minuten gemessen. Es folgte die Gabe von 1 ng/ml BDNF. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde die Messung desselben Mikroskopausschnitts wiederholt.

### Auswertung

Die Auswertung der Calcium Imaging Ergebnisse erfolgte über die ImageJ Software. Jede Messung mit jeweils 500 oder 1000 Einzelaufnahmen wurde als AVI Videodatei registriert und in das Programm eingespielt. Die Tools *Intensity vs Time Monitor* und *Time Series Analyzer V2.0* ermöglichten eine graphische Darstellung der Intensität pro Zeit (*Frames*) für jede Region des Videos (ROI = *region of interest*). Es wurde zunächst ein Hintergrundbereich für die Bestimmung der Grundaktivität (*Baseline*) ausgewählt, danach folgten die definierten Regionen der Wachstumskegel aller sich auf dem Sichtfeld befindlichen Motoneurone. Es wurden alle Spikes einzeln gezählt und deren Frequenz pro Bedingung bestimmt. Ein Spike wurde definiert als Anstieg der Intensität um mehr als das Doppelte der für diesen Bildbereich geltenden *Baseline*-Schwankung. Zudem musste beachtet werden, dass der Anstieg der Intensität steil erfolgte, nicht in ein Plateau mündete und kein gleichzeitiger negativer Ausschlag an der Stelle vorlag. Das Auftreten von Artefakten wurde bei der Analyse der Spikes berücksichtigt. Dazu zählten äußere Lichteinflüsse, Lageveränderungen des

Deckgläschen in der Kammer, Bleichungseffekte, Aufnahmen außerhalb des Kamerafokus und interzellulärer Aktivitätsübertragungen.

#### **4.2.8 Western Blot**

##### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE und den späteren Western Blot wurden 30.000 – 50.000 Motoneurone pro Bedingung ausplattiert. An DIV5 wurde das Medium entfernt und die Motoneuronen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 2x Lämmli-Puffer lysiert und anschließend für 5 min bei 99°C aufgeköcht. Die Proteinlysate wurden auf ein 1 mm dickes Polyacrylamidgel geladen, das aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 10%-igen Trenngel bestand und bei konstanten 20 mA (Sammelgel) oder 27 mA (Trenngel) bei 4°C nach ihrer Protein-Größe aufgetrennt wurden. Ein vorgefärbter Proteinmarker diente als Referenzwert und wurde zusätzlich aufgetragen.

##### Semi-dry Western-Blot

Durch den anschließenden Western Blot wurden die nach der Größe aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde Blotting-Papier in Transferpuffer getränkt und auf die untere Blot-Elektrode gelegt. Die PVDF Membran wurde zunächst für 2 min in Methanol aktiviert, dann im Transferpuffer äquilibriert und auf dem Blotting-Papier platziert. Das Trenngel wurde vom Sammelgel abgelöst und vorsichtig aus der Elektrophoresekammer gehoben, ebenfalls im Transferpuffer äquilibriert und auf die PVDF Membran gelegt. Es folgte eine weitere Schicht mit in Transferpuffer getränktem Blotting-Papier. Mögliche Luftblasen wurden durch Walzen entfernt. Der Deckel wurde verschlossen und der Western Blot für 3 Stunden bei 5 Volt, 3 Amper und 300 Watt gestartet.

##### Blocking und Antikörper

Die PVDF-Membran wurde aus der semi dry Western-Blot-Kammer entnommen und für eine Stunde bei RT in 5%-iger fettarmer Milch in TBS-T gelöst sanft geschwenkt. Die Membran wurde mit den entsprechenden Primärantikörpern in

5%-iger fettarmer Milch in TBS-T gelöst über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag folgten 3 Waschschrirte mit TBS-T (1x) à 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit Sekundärantikörperlösung in 5%-iger fettarmer Milch in TBS-T gelöst bei RT inkubiert. Unter Lichtausschluss wurde ECL-Lösung auf die Membran gegeben. Es folgte die Entwicklung der Chemilumineszenz-Signale auf einem Röntgenfilm. Die Proteinbanden lagen bei 31 kDa (Cdk5), 40 kDa (Smn) und 90 kDa (Calnexin).

#### **4.2.9 Statistik**

Als Statistikprogramm zur Auswertung wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Die absolute Zahl der Einzelmessungen wurde als  $N$  definiert, die Zahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche als  $n$ . Falls nicht anders angegeben, wurden pro Experiment 5 Versuchsreihen durchgeführt, sowie die Gesamtergebnisse als Säulendiagramme dargestellt, die den Mittelwert (MW) und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) repräsentierten. Für die statistische Auswertung wurde zunächst der *d'Agostino Pearson Normality Test* durchgeführt. Handelte es sich um normal verteilte Werte (Gauß-Verteilung), wurde der *one-way ANOVA* mit *Tukey's post hoc* Analyse angewandt, bei nicht-normal verteilten Werten der *Kruskall-Wallis Test* mit *Dunn's Multiple Comparison Post-Hoc Test*. Signifikanzen wurden in den Abbildungen als Sternchen dargestellt: \*  $p = 0,05$ ; \*\*  $p = 0,01$ ; \*\*\*  $p = 0,001$ .

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Der Einfluss von R-Roscovitine auf das Überleben und die Differenzierung von Motoneuronen aus einem Mausmodell für SMA Typ 1

#### 5.1.1 Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von R- und S-Roscovitine auf das Überleben wildtypischer Motoneurone

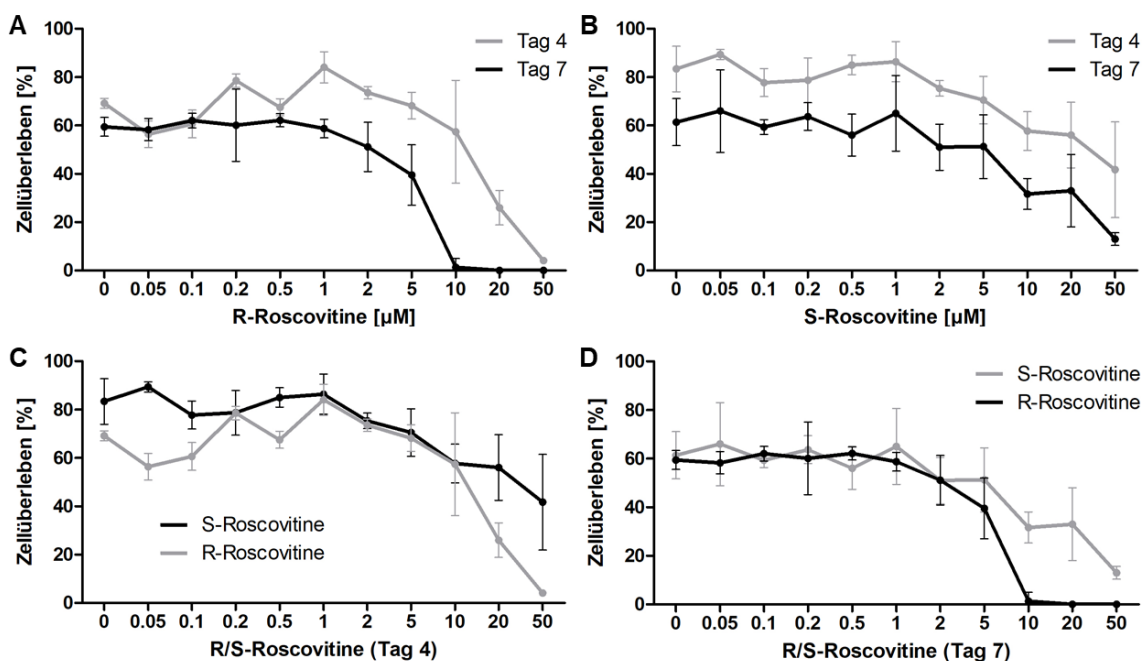
Da Roscovitine vor allem als Cdk Inhibitor bekannt ist, beruhen die Erfahrungen mit Roscovitine in der Zellkultur hauptsächlich auf Tumorzelllinien. Dabei lagen die verwendeten Konzentrationen für Zellen des Kolon-, Mamma-, oder kleinzelligen Lungenkarzinoms zwischen 15 und 50  $\mu\text{M}$  R-Roscovitine (Lacrima *et al.*, 2005; Raynaud *et al.*, 2005; Wesierska *et al.*, 2005; Schutte *et al.*, 1997). Vor Beginn des Einsatzes von Roscovitine in der primären Motoneuron-Zellkultur wurden deshalb verschiedene Konzentrationen von R- und S-Roscovitine auf das Überleben von Motoneuronen aus dem wildtypischen C57BL/6 Mausmodell getestet<sup>4</sup>. Die Zellen wurden für sieben Tage unter dem kontinuierlichen Einfluss der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF auf Laminin-221/211 kultiviert. Dazu wurden in Konzentrationsreihen mit R- und S-Roscovitine die Zellzahlen der überlebenden Motoneurone an Tag 1, 4 und 7 bestimmt, woraus sich das prozentuale Überleben berechnete. Eine Konzentration von maximal 0,5  $\mu\text{M}$  R-Roscovitine erwies sich dabei für die Motoneuronen nach 7 Tagen Zellkultur als tolerabel (Abbildung 6A, D; Tabelle 4). In allen folgenden Zellkulturexperimenten wurde deshalb 0,5  $\mu\text{M}$  als Standardkonzentration für R-Roscovitine und dessen Derivate festgelegt. Der Grund für die geringe Konzentration im Vergleich zum Einsatz von Roscovitine in anderen Zellkulturen liegt womöglich in der hohen Vulnerabilität der primären Motoneurone, insbesondere der primären SMA Motoneurone als Einzelzellkultur.

Um zu überprüfen, ob die toxische Wirkung des höher konzentrierten R-Roscovitines (10-50  $\mu\text{M}$ ) auf die wildtypischen Motoneurone auf eine spezifische Wirkung des R-Roscovitines auf den Cav2.2 Kalziumkanal zurückzuführen ist,

---

<sup>4</sup> Datenerhebung der Experimente mit R-Roscovitine durch Dr. Hans Drexl

wurde zusätzlich eine Konzentrationsreihe mit S-Roscovitine durchgeführt, da für S-Roscovitine kein Effekt auf den  $Ca_v2.2$  Kalziumkanal beschrieben ist (Cho & Meriney, 2006). Bei hohen Konzentrationen (10-50  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich ein geringerer Abfall des Zellüberlebens mit S-Roscovitines als mit R-Roscovitine (Abbildung 6B, D; Tabelle 4) Diesem qualitativen Effekt liegt hier womöglich eine toxische Wirkung des zu hohen Kalziumeinstroms in des Zellinnere durch die  $Ca_v2.2$  Kanalwirkung des R-Roscovitines zugrunde.



### Abbildung 6: Konzentrationsreihen mit R- und S-Roscovitine

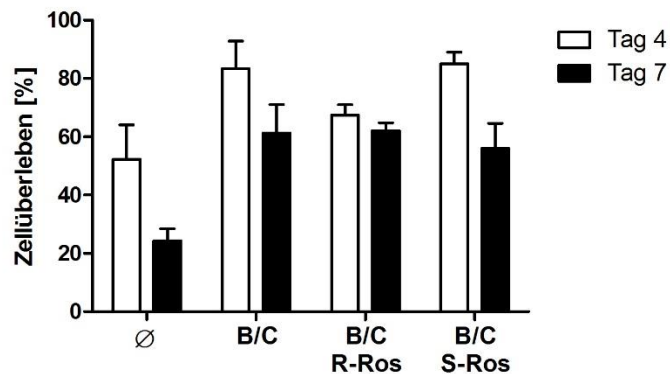
A-D: Zellüberleben der wildtypischen Motoneurone nach 4 Tagen unter dem Einfluss von R-Roscovitine (A, C), oder S-Roscovitine (B, C) und nach 7 Tagen unter dem Einfluss von R-Roscovitine (A, D) und S-Roscovitine (B, D). Ab einer Konzentration von 1-2  $\mu\text{M}$  R- und S-Roscovitine konnte eine Abnahme des Motoneuron-Überlebens festgestellt werden.

In einem Kontrollexperiment wurde das prozentuale Überleben wildtypischer Motoneurone mit und ohne kontinuierliche Zufuhr der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF bestimmt. Unter Einfluss von BDNF und CNTF betrug das Überleben der Motoneurone nach 7 Tagen Zellkultur ca. 60%.

%	R-Roscovitine		S-Roscovitine	
$\mu\text{M}$	Tag 4	Tag 7	Tag 4	Tag 7
0,00	69,17 $\pm$ 2,02	59,43 $\pm$ 3,89	83,33 $\pm$ 9,45	61,33 $\pm$ 9,71
0,05	56,33 $\pm$ 5,51	58,23 $\pm$ 4,52	89,33 $\pm$ 2,08	66,00 $\pm$ 17,1
0,10	60,57 $\pm$ 5,75	62,00 $\pm$ 3,00	77,67 $\pm$ 5,77	59,33 $\pm$ 3,06
0,20	78,53 $\pm$ 2,83	60,10 $\pm$ 14,9	78,67 $\pm$ 9,29	63,67 $\pm$ 5,69
0,50	67,47 $\pm$ 3,50	62,10 $\pm$ 2,71	85,00 $\pm$ 4,00	56,00 $\pm$ 8,66
1,00	86,20 $\pm$ 7,35	58,70 $\pm$ 3,84	86,33 $\pm$ 8,32	65,00 $\pm$ 15,6
2,00	73,50 $\pm$ 2,61	51,10 $\pm$ 10,2	75,33 $\pm$ 3,21	51,00 $\pm$ 9,54
5,00	68,13 $\pm$ 5,46	39,47 $\pm$ 12,5	70,50 $\pm$ 9,81	51,25 $\pm$ 13,2
10,0	57,36 $\pm$ 21,2	1,300 $\pm$ 3,68	57,66 $\pm$ 8,02	31,67 $\pm$ 6,43
20,0	25,93 $\pm$ 7,11	0,000 $\pm$ 0,00	56,00 $\pm$ 13,5	33,00 $\pm$ 14,9
50,0	4,080 $\pm$ 1,41	0,000 $\pm$ 0,00	41,67 $\pm$ 19,8	13,00 $\pm$ 2,65

**Tabelle 4: Konzentrationsreihen mit R- und S-Roscovitine** (prozentuale Angabe des Mittelwertes mit Standardabweichung; N = 30-100; n = 3-9)

Diese Überlebensrate blieb durch die zusätzliche Gabe von 0,5  $\mu\text{M}$  R- oder S-Roscovitine unbeeinflusst. Ohne Zusatz von BDNF und CNTF sank das Überleben der Motoneurone auf ca. 20% (Abbildung 7; Tabelle 5).



**Abbildung 7: Überlebensraten wildtypischer Motoneurone ohne BDNF und CNTF**  
Fehlen die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF, sinkt das prozentuale Überleben der wildtypischen Motoneurone auf ca. 20%. Unter Zufuhr der neurotrophen Faktoren steigt das Überleben auf ca. 60%. 0,5  $\mu\text{M}$  Roscovitine hat auf das Überleben der Motoneurone keinen zusätzlichen Einfluss.



%	Unbehandelt	BDNF, CNTF	BDNF, CNTF + 0,5 µM R-Ros	BDNF, CNTF + 0,5 µM S-Ros
Tag 4	52,33 ± 11,7	83,33 ± 9,45	67,47 ± 3,50	85,00 ± 4,00
Tag 7	24,33 ± 4,16	61,33 ± 9,71	62,10 ± 2,71	56,00 ± 8,66

**Tabelle 5: Überlebensraten wildtypischer Motoneurone ohne BDNF und CNTF** (prozentuale Angabe des Mittelwertes mit Standardabweichung; N = 30-100; n = 3)

Anhand dieser ersten Versuchsreihen wurde die Konzentration von Roscovitine bestimmt, die für primäre, wildtypische Motoneuronen in der Einzelzellkultur noch tolerabel ist. Die Stereoisomere R- und S-Roscovitine wurden untereinander verglichen, wobei sich ein geringerer Abfall des Motoneuron-Überlebens bei hohen Konzentrationen unter S-Roscovitine zeigte. Dieser positive Effekt von S-Roscovitine ist möglicherweise auf die fehlende Wirkung am Kalziumkanal zurückzuführen. Die Experimente machen zudem deutlich, welchen essentiellen Einfluss die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF auf das Langzeitüberleben der Motoneurone in der Zellkultur haben.

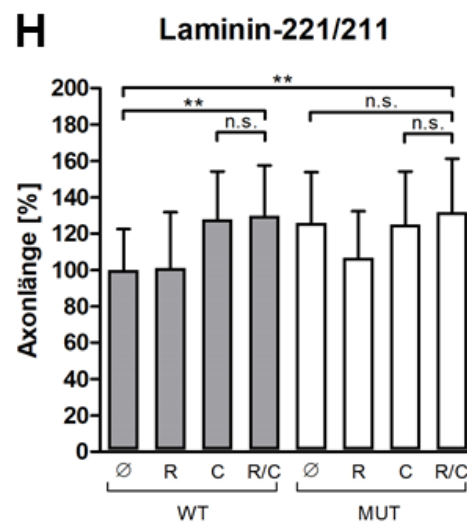
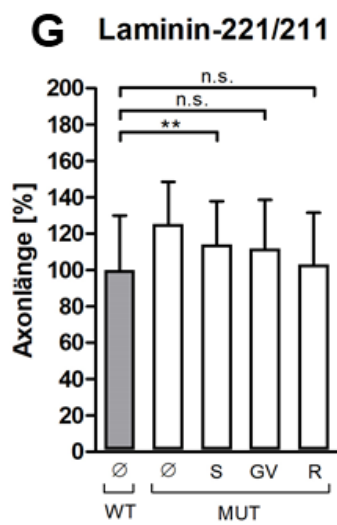
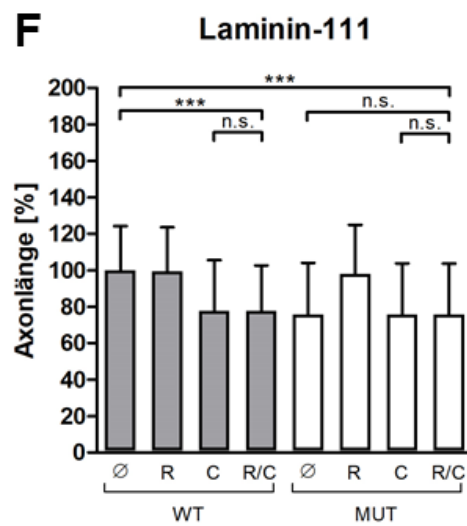
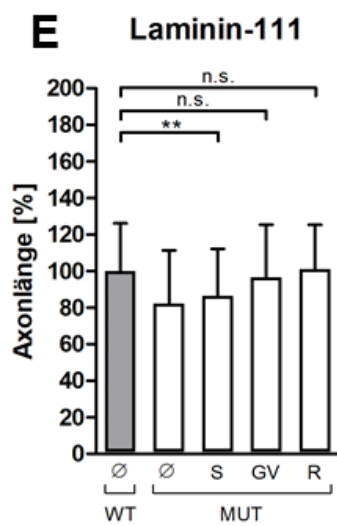
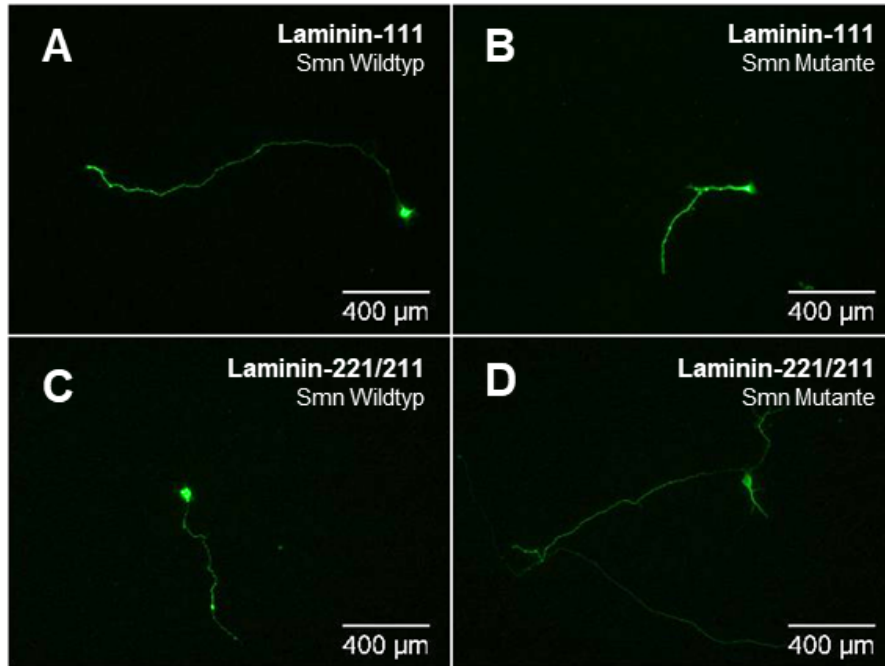
### 5.1.2 Der Vergleich von Cav2.2-Agonisten und Cdk5-Inhibitoren in Bezug auf die Axonlängen von SMA-Motoneuronen

Axonlängen dienen als morphologische Parameter, um den Entwicklungszustand von Motoneuronen einzuschätzen. Die Beurteilung der Axonlänge ist dabei abhängig von der Laminin-Beschichtung der Zellkulturschale (siehe Kapitel 2.1.3). Abhängig von der Plattenbeschichtung korreliert ein gut entwickeltes Motoneuron mit einem langen Axon auf Laminin-111 und einem kurzen Axon auf Laminin-221/211. Auf beiden Laminin-Beschichtungen zeigen sich signifikante Unterschiede der Axonlänge zwischen Wildtyp und SMA Mutante. Dies ist die Voraussetzung für die Untersuchung der folgenden Substanzen:

<b>R-Roscovitine (R):</b>	Ca <sub>v</sub> 2.2 Agonist und Cdk5 Antagonist
<b>S-Roscovitine (S):</b>	alleiniger Cdk5 Antagonist
<b>GV-58 (GV):</b>	alleiniger Ca <sub>v</sub> 2.2 Agonist
<b>ω-Conotoxin (C):</b>	alleiniger Ca <sub>v</sub> 2.2 Antagonist

Die Axonlängen der unbehandelten SMA-Mutante (Abbildung 8E, MUT Ø) waren auf Laminin-111 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 8E, WT Ø) um etwa 20% reduziert, auf Laminin-221/211 um etwa 20% angehoben (Abbildung 8G). Somit zeigten SMA Motoneuronen im Vergleich zum Wildtyp Einschränkungen der Differenzierung. Die Behandlung der SMA-Motoneuronen mit S-Roscovitine (Abbildung 8E, MUT S) erwies sich als nicht signifikant. Die Behandlung der SMA Motoneurone mit GV-58 (Abbildung 8E, MUT GV) oder R-Roscovitine (Abbildung 8E, MUT R) zeigte einen signifikanten Anstieg der Axonlängen auf Laminin-111. Auch auf Laminin-221/211 ließ sich mit R-Roscovitine (Abbildung 8G, MUT R) und GV-58 (Abbildung 8G, MUT GV-58) eine signifikante Veränderung der Axonlängen bei SMA Motoneuronen erzielen, nicht jedoch mit S-Roscovitine (Abbildung 8G, MUT S). Der Vergleich der unterschiedlichen Substanzen in dieser Versuchsreihe deutet darauf hin, dass der positive Effekt von R-Roscovitine auf die Axonlängen durch einen Agonismus am Kalziumkanal zustande kommt und nicht durch eine Cdk5-Blockade.

Im Anschluss wurde getestet, ob R-Roscovitine weiterhin einen positiven Effekt auf die Axonlängen von SMA-Motoneuronen hat, wenn dessen extrazelluläre Bindungsstelle am Kalziumkanal zeitgleich durch den Kanalantagonisten  $\omega$ -Conotoxin (Agonisten und Antagonisten spannungsabhängiger Kalziumkanäle siehe Kapitel 2.1.2) blockiert ist. Eine Behandlung wildtypischer Zellen mit  $\omega$ -Conotoxin (Abbildung 8F, WT C) führte zu einer Reduktion der Axonlängen um ca. 20% auf Laminin-111 (Abbildung 8H, WT C). Bei der SMA-Mutante ließ sich kein Unterschied zwischen unbehandelten Motoneuronen (Abbildung 8F, MUT Ø) und mit  $\omega$ -Conotoxin behandelten Motoneuronen (Abbildung 8F, MUT C) erkennen. Eine Blockade des  $Ca_v2.2$  Kalziumkanals führt also zu einem Differenzierungsdefekt des Motoneurons, der vom Ausmaß her mit dem Differenzierungsdefekt der SMA Motoneurone vergleichbar ist. Die Funktion des  $Ca_v2.2$  Kalziumkanals erscheint somit für eine normale Entwicklung der Motoneurone essentiell. Eine simultane Behandlung mit  $\omega$ -Conotoxin und R-Roscovitine ergab sowohl beim Wildtyp (Abbildung 8F, WT R/C) als auch bei der SMA-Mutante (Abbildung 8F, MUT R/C) keine Veränderungen im Vergleich zu einer alleinigen  $\omega$ -Conotoxin Behandlung (Abbildung 8F, MUT C).



### **Abbildung 8: Der Effekt von R-Roscovitine, S-Roscovitine, $\omega$ -Conotoxin und GV-58 auf die Axonlängen von SMA-Motoneuronen**

A-D: Beispielbilder. Motoneurone des Wildtyps zeigen längere Axone auf Laminin-111 (A) und kürzere Axone auf Laminin-221/211 (C), Motoneurone der SMA Mutante zeigen kürzere Axone auf Laminin-111(B) und längere Axone auf Laminin-221/211 (D). Tau-Färbung der Axone. E-H: Quantitative Auswertung der Axonlängen der behandelten SMA Motoneurone auf Laminin-111 (E, F) und Laminin-221/211 (G, H) im Vergleich zum SMA Wildtyp.  $\emptyset$  = unbehandelt, S = S-Roscovitine, GV = GV-58, R = R-Roscovitine, C =  $\omega$ -Conotoxin, R/C = R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin, WT = SMA-Wildtyp, MUT = SMA-Mutante, n.s. = nicht signifikant; \*\* Signifikanz <0,01; \*\*\* Signifikanz <0,001.

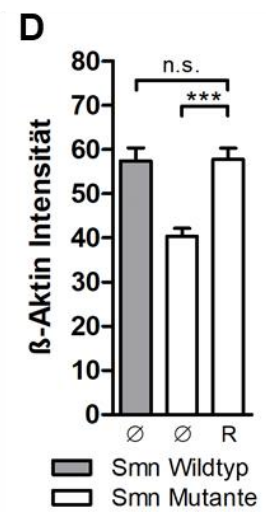
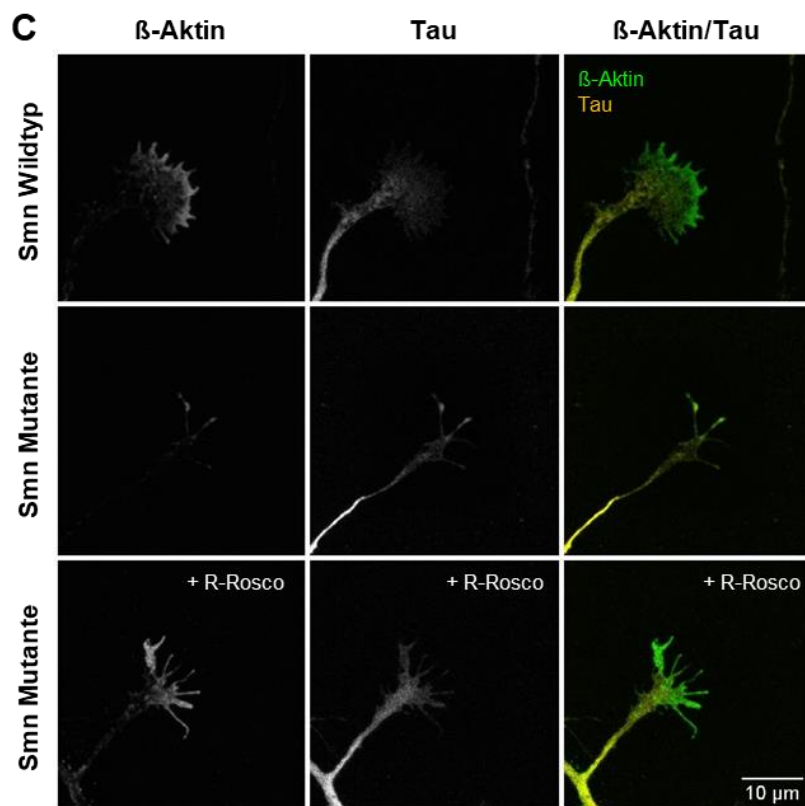
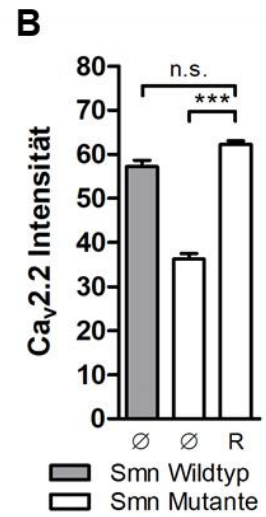
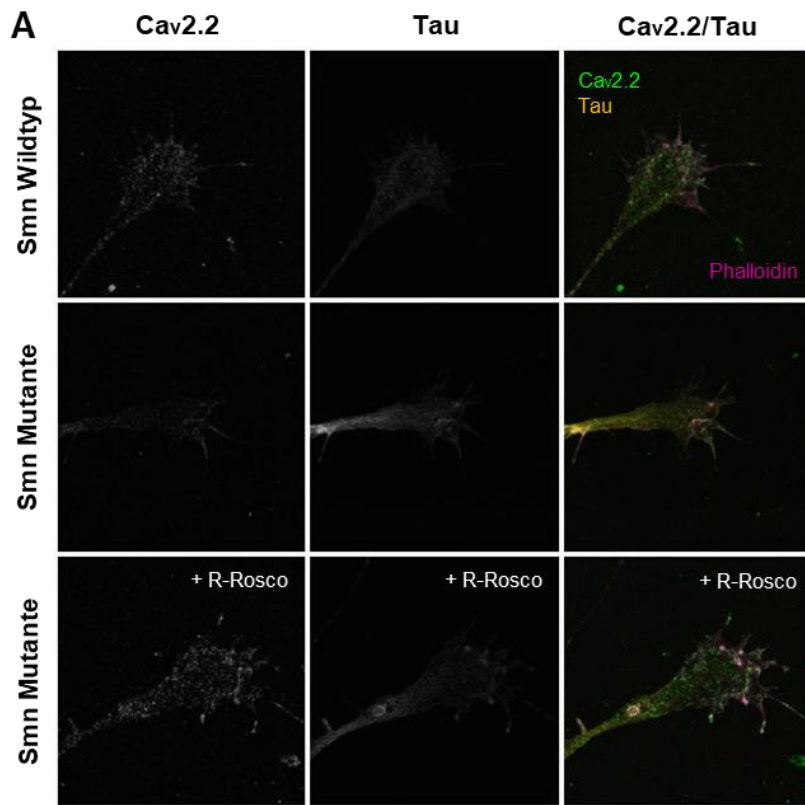
Auf Laminin-221/211 zeigten sich entsprechende Ergebnisse (Abbildung 8H)<sup>5</sup>. Wird also unter  $\omega$ -Conotoxin Behandlung zusätzlich R-Roscovitine gegeben, ändert sich die Axonlänge nicht. Da  $\omega$ -Conotoxin den  $Ca_v2.2$  Kalziumkanal vollständig blockiert, kann R-Roscovitine nicht mehr binden und die positive Wirkung des R-Roscovitines auf die Motoneurone geht verloren. Die gleichbleibenden Axonlängen bei simultaner Behandlung der Motoneurone mit R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin sind ein Hinweis darauf, dass die positive Wirkung des R-Roscovitine auf einer direkten Bindung des  $Ca_v2.2$  Kalziumkanals beruht und nicht durch einen Signalweg indirekt hervorgerufen wird.

#### **5.1.3 Der Einfluss von R-Roscovitine auf die Differenzierung des Wachstumskegels in SMA-Motoneuronen**

Nun stellt sich die Frage, ob sich auch die verminderte  $Ca_v2.2$  Clusterbildung durch die Behandlung mit R-Roscovitine über 5 Tage hinweg aufheben lässt. Dabei wurde zwischen unbehandelter und mit R-Roscovitine behandelter SMA-Mutante unterschieden. Nach 5-tägiger Zellkultur wurde der Kalziumkanal am Wachstumskegel mithilfe immunzytochemischer Verfahren gefärbt und deren Intensität mit dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Basierend auf früheren Studien ist bekannt, dass auch das Protein  $\beta$ -Aktin in Smn-defizienten Motoneuronen reduziert ist (Rossoll *et al.*, 2003; Zhong & Zucker, 2004; Rathod *et al.*, 2012). Daher wurde eine Doppelfärbung mit  $Ca_v2.2$  und  $\beta$ -Aktin durchgeführt.

---

<sup>5</sup> Datenerhebung in Zusammenarbeit mit Dr. Hans Drexl und Dr. Benjamin Dombert



### **Abbildung 9: Ca<sub>v</sub>2.2 und β-Aktin am Wachstumskegel von SMA-Motoneuronen unter dem Einfluss von R-Roscovitine**

A, C: Beispielbilder von Wachstumskegeln des SMA Wildtyps, der unbehandelten SMA Mutante und der mit R-Roscovitine behandelten SMA Mutante. Gezeigt ist die Expression des Ca<sub>v</sub>2.2 Kalziumkanals und des Proteins β-Aktin; Als Hintergrundfärbung wurde Tau und Phalloidin gewählt. R-Rosco = R-Roscovitine. B, D: Quantifizierung der Ca<sub>v</sub>2.2 Expression (B) und der β-Aktin Expression am Motoneuronenwachstumskegel des unbehandelten SMA Wildtyps (grauer Balken, Ø), der unbehandelten SMA Mutante (weißer Balken, Ø) und der mit R-Roscovitine behandelten SMA Mutante (weißer Balken, R); Ø = unbehandelt, R = R-Roscovitine, n.s. = nicht signifikant, \*\*\* p<0,001

Für beide getesteten Proteine wurde eine deutliche Reduktion am Wachstumskegel von SMA-Motoneuronen im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen festgestellt. Dieses Defizit ließ sich durch eine Behandlung mit R-Roscovitine wieder signifikant ausgleichen, sodass sich die Wachstumskegel der behandelten SMA-Motoneurone nicht mehr von den Wachstumskegeln wildtypischer Motoneurone unterscheiden (Abbildung 9).

Für den Ca<sub>v</sub>2.2 Kalziumkanal ist eine Reduktion der Proteinmenge in den Wachstumskegeln der SMA Motoneurone bereits vorher beschrieben (Jablonka *et al.*, 2007). Die kontinuierliche Behandlung mit R-Roscovitine über 5 Tage hinweg zeigte eine Zunahme der Ca<sub>v</sub>2.2 Menge am Wachstumskegel der SMA Motoneuronen (Abbildung 9A, B). Unter R-Roscovitine Behandlung befanden sich somit mehr Kalziumkanäle an den Wachstumskegeln der SMA Motoneurone, was den Kalziumeinstrom erhöht und die Differenzierung der Motoneurone vorantreibt.

#### **5.1.4 Der Einfluss von Ca<sub>v</sub>2.2 Agonisten und Antagonisten auf die spontanen Kalziumtransienten in SMA-Motoneuronen**

Die bisherigen *in vitro* Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass R-Roscovitine einen differenzierungsfördernden Effekt auf Motoneuronen aus dem SMA Mausmodell zu haben scheint. Dies konnte anhand morphologischer Zielgrößen gezeigt werden. Die Axonlängen der Motoneurone und die Expression von Ca<sub>v</sub>2.2 und β-Aktin nähern sich unter R-Roscovitine wildtypischen Werten an. Vergleichsexperimente mit S-Roscovitine, GV-58 und ω-Conotoxin zeigen, dass dieser Effekt am wahrscheinlichsten durch eine agonistische Wirkung am Ca<sub>v</sub>2.2

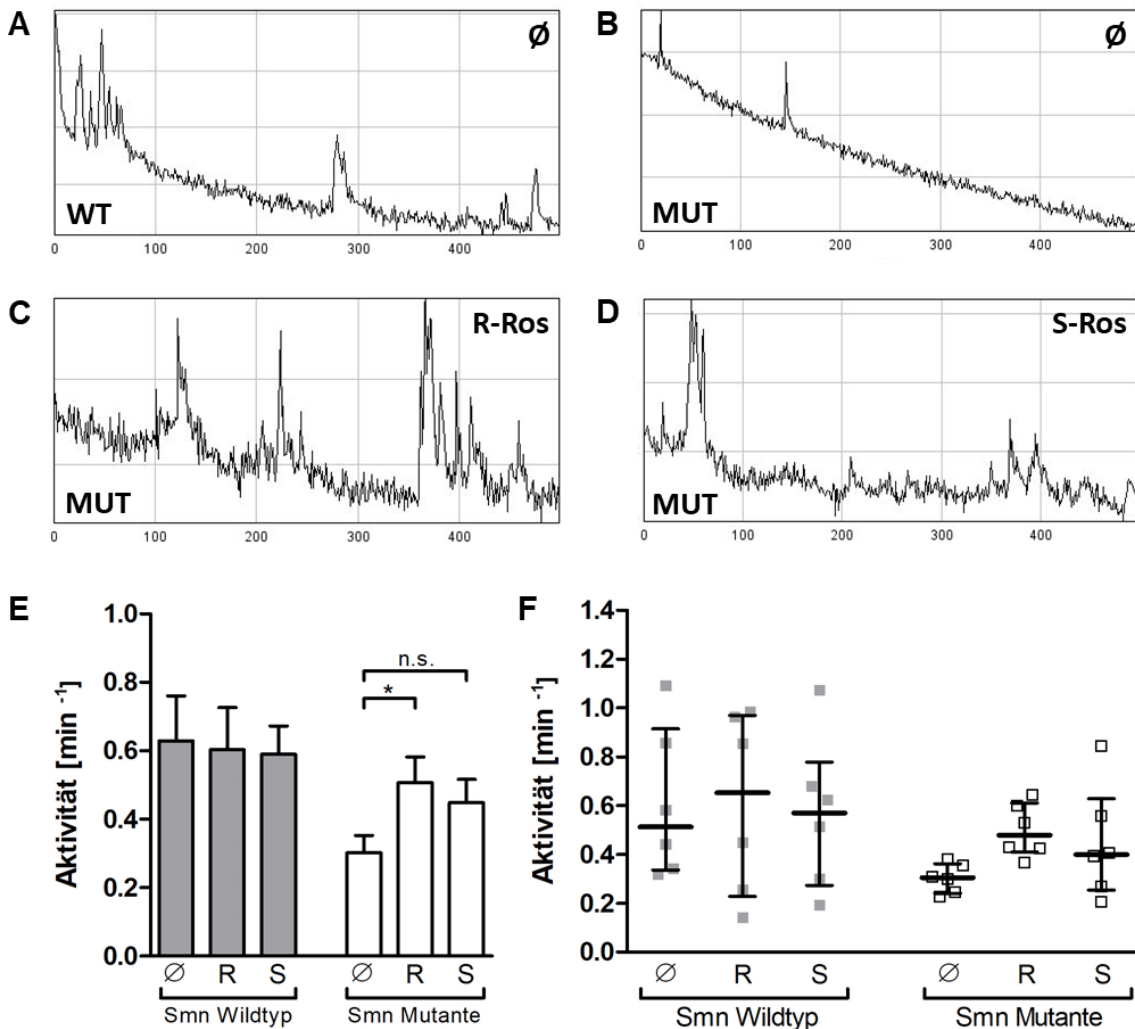
Kalziumkanal verursacht wird. In den anschließenden Experimenten wurde deshalb untersucht, ob sich der Effekt durch R-Roscovitine auch auf funktioneller Ebene an Motoneuronen nachweisen lässt.

Die Frequenz spontaner Kalziumeinströme ist ein wichtiger Einflussfaktor für die Differenzierung der Motoneurone und die Ausbildung der neuromuskulären Synapse. Die lokalen Kalziumtransienten wurden im nachfolgenden Experiment per *live-cell Imaging* gemessen. An den Wachstumskegeln der Motoneurone wurde bestimmt, wie viel Kalzium pro Zeiteinheit durch die simultane Öffnung der Kalziumkanäle in die Zelle einströmt. Daraus ließen sich Rückschlüsse auf die spontane Grundaktivität der Motoneurone ziehen.

Es wurde der Einfluss von R- oder S-Roscovitine auf die Spontanaktivität der SMA-Motoneurone untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Die Gabe von R- oder S-Roscovitine erfolgte dabei kontinuierlich über 5 Tage. Es zeigte sich eine Reduktion der spontanen Aktionsfrequenz um ca. 50% am Wachstumskegel der SMA-Motoneurone im Vergleich zur Spontanaktivität wildtypischer Motoneurone. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass SMA-Motoneuronen nicht nur bezüglich ihrer Morphologie, sondern auch in ihrer Funktion gegenüber wildtypischen Motoneuronen eingeschränkt sind. Eine Behandlung mit R-Roscovitine führte bei SMA-Motoneuronen wieder zu einem signifikanten Anstieg der Spontanaktivität. Eine Behandlung mit S-Roscovitine führte ebenfalls zu einem Aktivitätsanstieg. Dieser war jedoch geringer und im Vergleich zur unbehandelten SMA Mutante nicht signifikant. Ähnlich wie bei den Axonlängen zeigte R-Roscovitine also auch funktionell einen besseren Effekt als S-Roscovitine. Daraus lässt sich schließen, dass der Effekt von R-Roscovitine eher durch eine agonistische Wirkung am  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal zustande kommt als durch eine Inhibition von Cdk5.

Durch die gleichzeitige Gabe des  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanalblockers  $\omega$ -Conotoxin wurde im Anschluss untersucht, ob die Gabe von R-Roscovitine einen Effekt auf die spontanen Kalziumtransienten der SMA-Motoneurone besitzt, wenn dessen Angriffspunkt am  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal durch  $\omega$ -Conotoxin blockiert ist. Die kontinuierliche, simultane Gabe von  $\omega$ -Conotoxin und R-Roscovitine führte im Gegensatz zur alleinigen Gabe von R-Roscovitine zu keinem Anstieg der Spontanaktivität in den SMA-Motoneuronen. Der  $\text{Ca}_v2.2$  Kalziumkanal als

Angriffspunkt für R-Roscovotine scheint daher für den positiven Effekt der SMA Motoneurone verantwortlich zu sein.



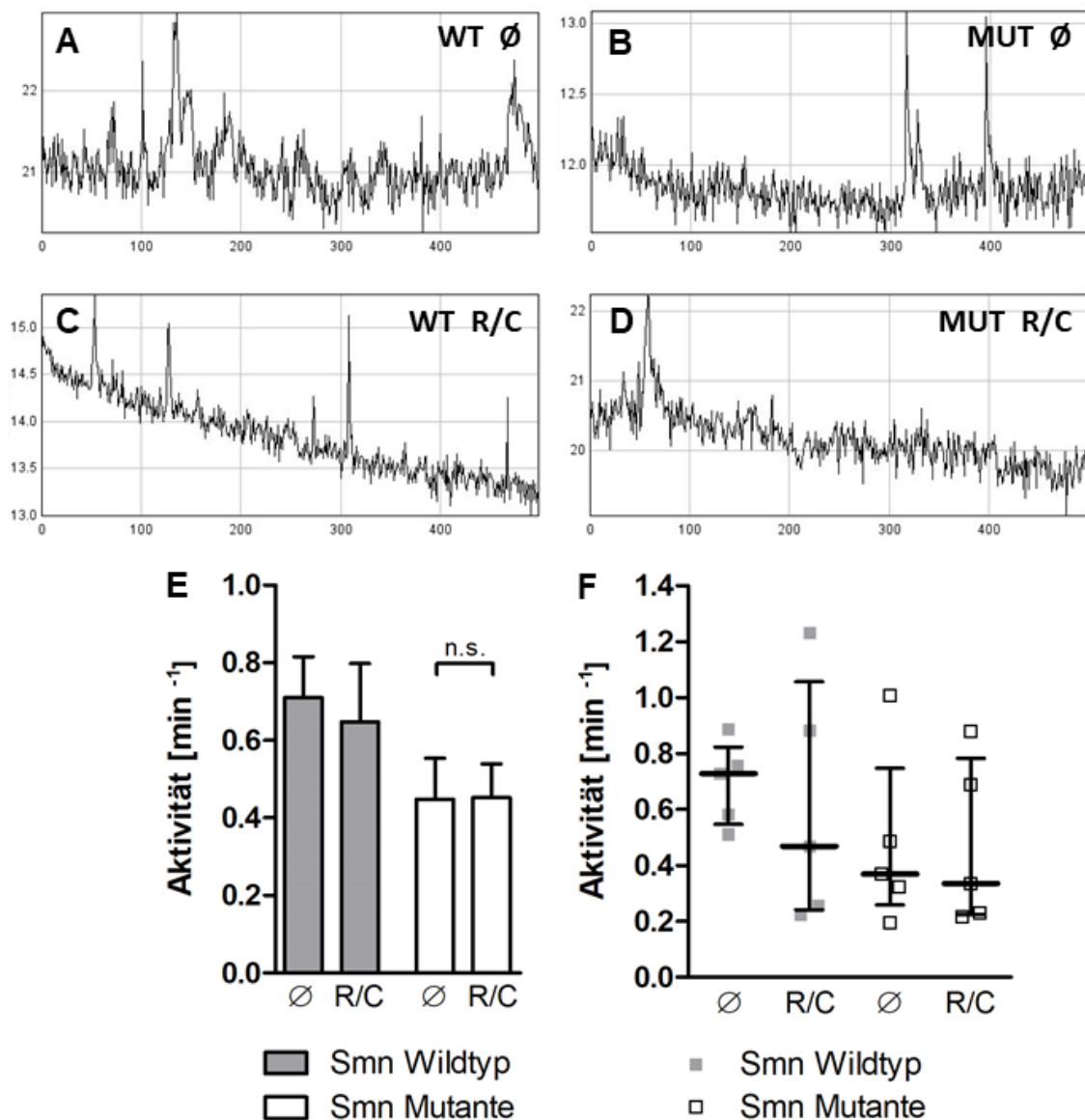
**Abbildung 10: Kalziumtransienten nach einer Langzeitbehandlung mit R- und S-Roscovitine an Motoneuronen aus dem SMA Mausmodell**

A-D: Beispielbilder der spontanen Kalziumtransienten am Motoneuronwachstumskegel beim unbehandelten Wildtyp (A), der unbehandelten SMA Mutante (B), der mit R-Roscovitine behandelten SMA Mutante (C) und der mit S-Roscovitine behandelten SMA Mutante (D), Aufgetragen ist die angepasste Fluoreszenzintensität gegen die im Zeitverlauf erstellten Aufnahmeserien, WT = SMA Wildtyp, MUT = SMA Mutante, R-Ros = R-Roscovitine, S-Ros = S-Roscovitine, Ø = unbehandelt. E-F: Quantifizierung der Aktionsfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte gegeneinander (E) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (F), graue Balken = Wildtyp, weiße Balken = SMA Mutante, Ø = unbehandelt, R = R-Roscovitine, S = S-Roscovitine, n.s. = nicht signifikant, \* Signifikanz <0,05.



Es existierten jedoch technische und statistische Limitationen bei dieser Methode, die die funktionelle Einschätzung der Motoneuronenaktivität erschwerten. Neben den bereits genannten externen Störfaktoren (siehe 4.2.7) war zu beachten, dass aufgrund der unterschiedlichen Wachstumskegelgrößen und der individuellen Aufnahme des Kalzium-Indikators Oregon Green keine einheitlichen Schwellenwerte festgelegt werden konnten, ab welcher Intensität eine Aktivität vorlag. Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde deshalb eine einheitliche Definition eines Aktivitätsanstiegs formuliert (siehe 4.2.7). Diese wurde vor jedem potenziellen Aktivitätsanstieg individuell geprüft.

Statistische Einschränkungen ergaben sich zum einen daraus, dass zwischen den Messungen der Lebendkulturen eine große Streubreite vorlag. Dies konnte verbessert werden, indem alle Bedingungen einer Messreihe innerhalb eines 4-Stunden Zeitfensters gemessen wurden. Ein weiteres Problem ergab sich daraus, dass die Wachstumskegel während der kurzen Beobachtungsdauer in den meisten Fällen gar keine Aktivität zeigten. Es blieb daher unklar, ob die fehlende Aktivität aus einem vollständigen Funktionsverlust resultierte, oder durch eine erniedrigte Aktivitätsfrequenz begründet war. Da es nicht möglich war, diese beiden Möglichkeiten sicher voneinander zu unterscheiden, wurden für die Auswertung ausnahmslos alle Wachstumskegelmessungen gezählt. Statistisch ergab sich so ein negativ-exponentieller Verlauf, der einer auf Normalverteilung ausgelegten Signifikanzauswertung nur schwer zugänglich war. Die Ergebnisse aus den Calcium Imaging Daten sind daher eher als qualitativ zu betrachten.



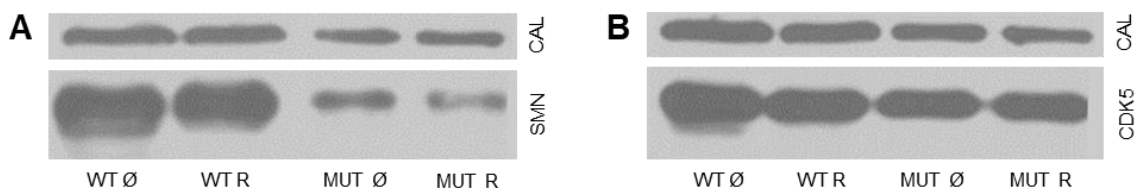
**Abbildung 11: Kalziumtransienten nach einer simultanen Behandlung mit R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin an Motoneuronen aus dem SMA Mausmodell**

A-D: Beispielbilder der spontanen Kalziumtransienten beim unbehandelten Wildtyp (A), der unbehandelten SMA Mutante (B), des mit R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin behandelten Wildtyps (C) und der mit R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin behandelten SMA Mutante (D), E-F: Quantifizierung der Aktionsfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte gegeneinander (E) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (F), graue Balken = Wildtyp, weiße Balken = SMA Mutante, WT = Wildtyp, MUT = SMA Mutante, R = R-Roscovitine, C =  $\omega$ -Conotoxin,  $\emptyset$  = unbehandelt. n.s. = nicht signifikant

### 5.1.5 Der Einfluss von R-Roscovitine auf die Proteinmenge von SMN und Cdk5 in SMA-Motoneuronen

Um auszuschließen, dass der Effekt von R-Roscovitine auf einer veränderten Regulation der SMN Proteinlevel auf molekulargenetischer Ebene basiert, wurde im Folgenden qualitativ bestimmt, wie viel SMN Protein sich in Motoneuronen aus dem Wildtyp im Vergleich zu Motoneuronen der SMA Mutante befindet und ob diese Proteinmenge durch die kontinuierliche Gabe von R-Roscovitine beeinflusst wird. Zusätzlich wurde getestet, ob sich das CDK5 Level in Motoneuronen des Wildtyps und der SMA Mutante unter der kontinuierlichen Gabe von R-Roscovitine unterscheidet.

Es zeigte sich, dass das SMN Level in SMA-Motoneuronen, wie zu erwarten, deutlich reduziert ist. Die SMN Menge wurde weder in wildtypischen noch in SMA-Motoneuronen von R-Roscovitine beeinflusst. Ebenso konnte für die CDK5 Proteinmenge zwischen Wildtyp und SMA Mutante und zwischen unbehandelten und mit R-Roscovitine behandelten Motoneuronen kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Dies weist daraufhin, dass der positive Effekt von R-Roscovitine durch ein lokales Geschehen am Wachstumskegel begründet ist und keinen Einfluss auf Gen- oder Proteinebene hat.

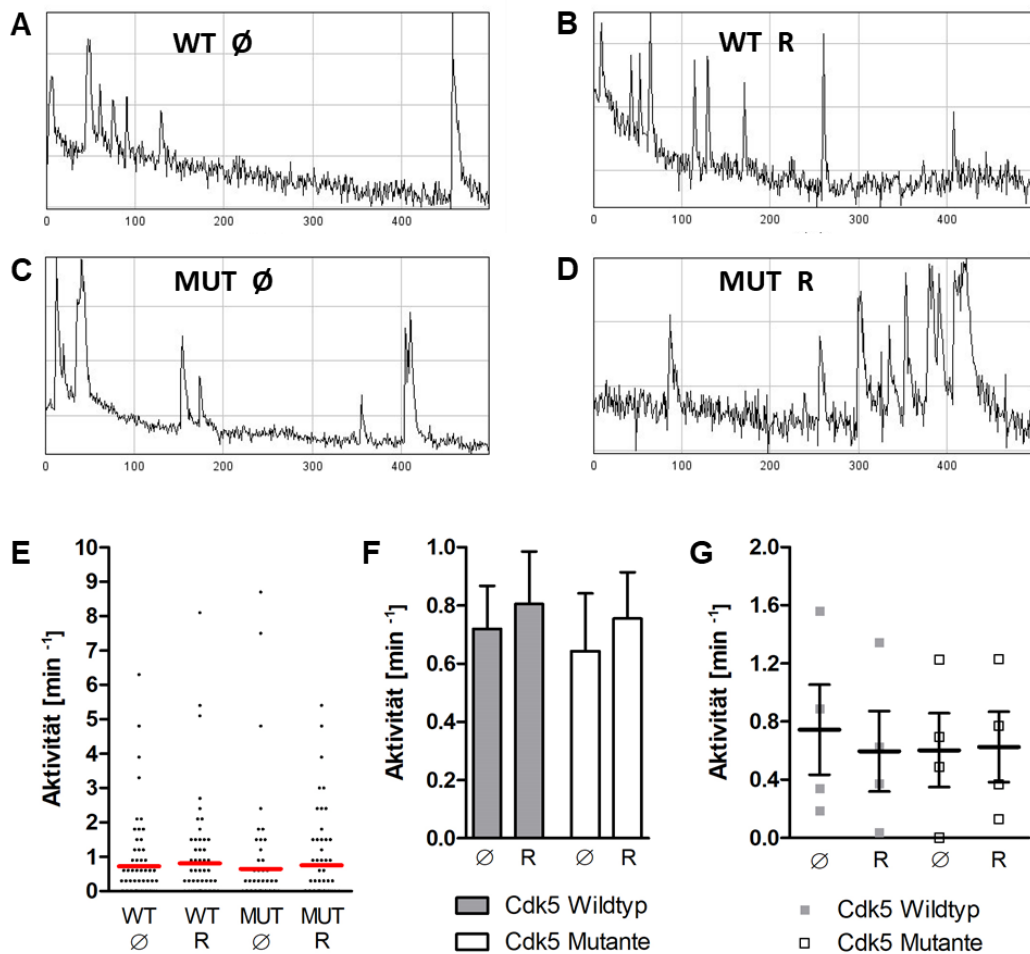


**Abbildung 12: Proteinlevel von SMN und Cdk5 nach R-Roscovitine Gabe in SMA-Motoneuronen**

A: Das SMN Proteinlevel in SMA-Motoneuronen (MUT Ø) ist im Vergleich zum Wildtyp (WT Ø) deutlich reduziert. B: Das Cdk5 Proteinlevel unterscheidet sich nicht zwischen Wildtyp und SMA Mutante. R-Roscovitine hat keinen Einfluss auf die Expression von SMN oder Cdk5 im Wildtyp (WT R) oder in der SMA Mutante (MUT R), Ladekontrolle Calnexin (Cal). R = R-Roscovitine, Ø = unbehandelt

### **5.1.6 Der Einfluss von R-Roscovitine auf spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem Cdk5<sup>-/-</sup> Mausmodell**

Da S-Roscovitine als alleiniger Cdk5-Antagonist ebenfalls zu einer geringen Zunahme der Spontanaktivität bei den SMA-Motoneuronen führte, besteht die Möglichkeit, dass die positive Wirkung von R-Roscovitine im vorhergehenden Experiment auch durch eine Cdk5-Blockade mitverursacht ist. Sollte die Wirkung von R-Roscovitine hauptsächlich über eine Cdk5-Blockade erfolgen, müsste sich durch einen genetischen Cdk5 *Knockout* derselbe Effekt erzielen lassen wie durch eine molekulare Blockade mit R- oder S-Roscovitine. Unter der Annahme, dass eine verbesserte Spontanaktivität durch eine Cdk5 Blockade zustande kommt, sollte also ein genetischer Cdk5 *Knockout* ebenfalls zu einer funktionellen Verbesserung der Motoneurone führen. Zwischen wildtypischen Motoneuronen und Motoneuronen aus dem Cdk5 Mausmodell ergaben sich keine funktionellen Unterschiede in Bezug auf die Kalziumtransienten (Abbildung 13). Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass der positive Effekt durch R-Roscovitine nicht durch eine Blockade der Cdk5 ausgelöst wird. Die Applikation von R-Roscovitine erhöhte sowohl die Spontanaktivität bei wildtypischen Zellen, als auch bei Motoneuronen aus dem Cdk5 *Knockout* Mausmodell. Dies macht deutlich, dass die Bindungsstelle über den Ca<sub>v</sub>2 Kalziumkanal weiterhin vorliegt, obwohl der Signalweg über Cdk5 wegfällt. Die Ergebnisse dieser Messung zeigen an, dass die Wirkung von R-Roscovitine unabhängig von Cdk5 erfolgt.



**Abbildung 13: Kalziumtransienten unter der Behandlung mit R-Roscovitine an Motoneuronen aus dem Cdk5 Mausmodell**

A-D: Beispielbilder der spontanen Kalziumtransienten des unbehandelten Wildtyps (A), des mit R-Roscovitine behandelten Wildtyps (B), der unbehandelten Cdk5 Mutante (C), und der mit R-Roscovitine behandelten Cdk5 Mutante (D), E: Vergleich aller Einzelmessungen dargestellt als Punkt für jede Aktivität, roter Balken: Mittelwert; F-G: Quantifizierung der Aktionsfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte gegeneinander (F) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (G), graue Balken = Wildtyp, weiße Balken = Cdk5 Mutante, WT = Wildtyp, MUT = SMA Mutante, R = R-Roscovitine,  $\emptyset$  = unbehandelt.

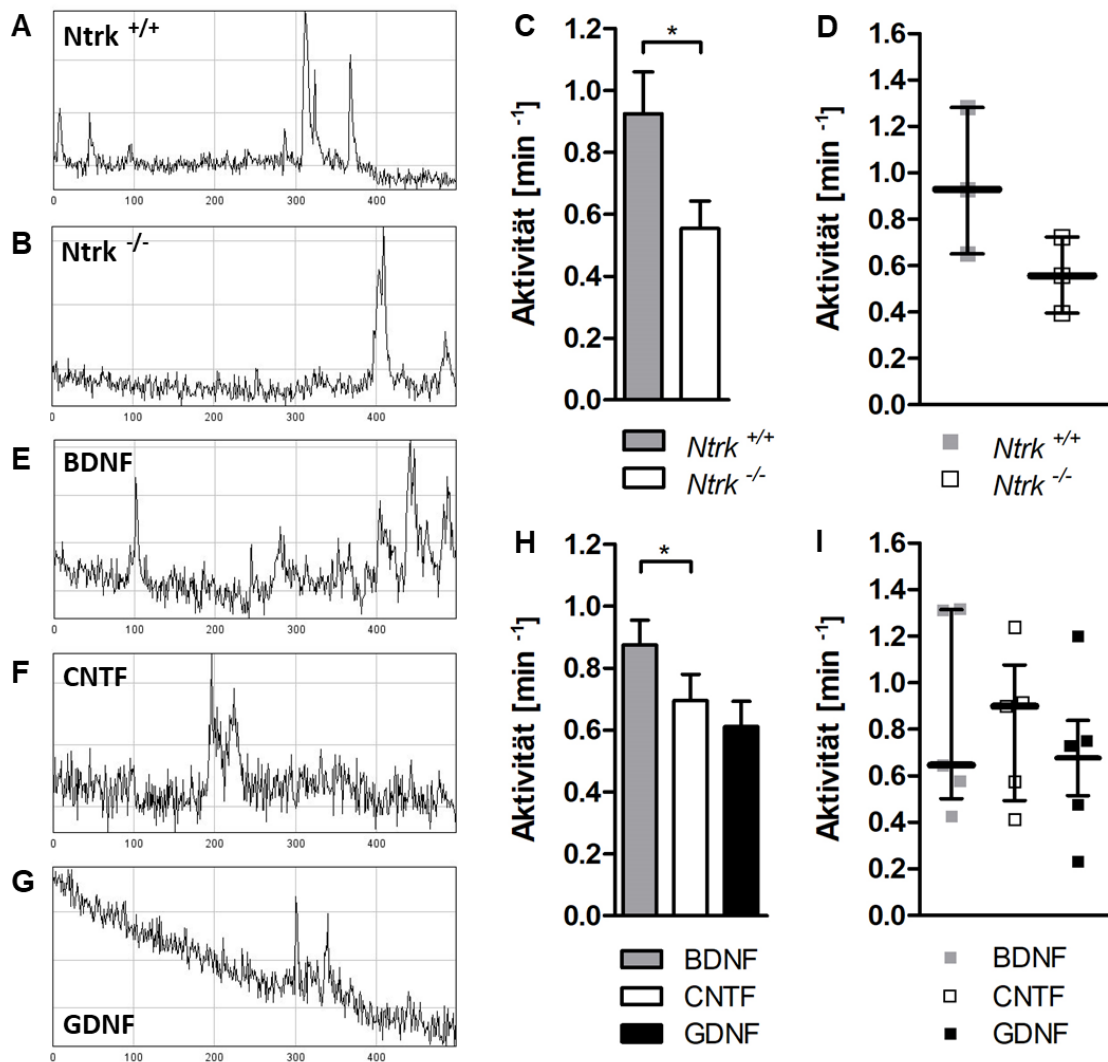
## **5.2 Der Einfluss neurotropher Faktoren auf spontane Kalziumtransienten in wildtypischen embryonalen Motoneuronen**

### **5.2.1 Spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem *trkB<sup>TK-/-</sup>* Mausmodell**

Der neurotrophe Faktor BDNF hat eine große Bedeutung für die Entwicklung von Motoneuronen (Ernfors *et al.*, 1990; Sendtner *et al.*, 1992; Oppenheim *et al.*, 1992, Yan *et al.*, 1992) Im Folgenden soll überprüft werden, ob die Kalziumkanäle am Motoneuronen-Wachstumskegel in den Signalweg von BDNF involviert sind. Es wurden dazu die Kalziumeinströme am Wachstumskegel von Motoneuronen aus dem *trkB<sup>TK-/-</sup>* Mausmodell bestimmt. Zellen des *trkB<sup>TK-/-</sup>* Mausmodells weisen einen Defekt in dem Rezeptor für BDNF (TrkB) auf. Fehlt die Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors für BDNF, kann der Rezeptor nicht mehr durch BDNF aktiviert werden und es kommt zu einer signifikanten Reduktion der Kalziumtransienten am Wachstumskegel (Abbildung 14 A-D). Ein Verlust des BDNF/TrkB Signalwegs führt somit zu einer Abnahme des lokalen Kalziumeinstroms, was ein Hinweis darauf ist, dass Kalziumkanäle in den Signalweg von BDNF über den TrkB Rezeptor involviert sein könnten.

### **5.2.2 Der Langzeiteinfluss von BDNF, CNTF und GDNF auf spontane Kalziumtransienten**

Neben BDNF sind auch CNTF und GDNF an der Entwicklung von Motoneuronen beteiligt (Sendtner *et al.*, 1990; Arakawa *et al.*, 1990; Henderson *et al.*, 1994). Im folgenden Experiment wird verglichen, welchen Einfluss die neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF auf den Kalziumeinstrom am Wachstumskegel wildtypischer Motoneurone haben. Unter der alleinigen Behandlung mit BDNF ließ sich nach 5 Tagen der größte Effekt auf die Kalziumtransienten erzielen. Darauf folgte CNTF. Unter GDNF zeigte sich die geringste Aktivität an den Wachstumskegeln (Abbildung 14 E-I).



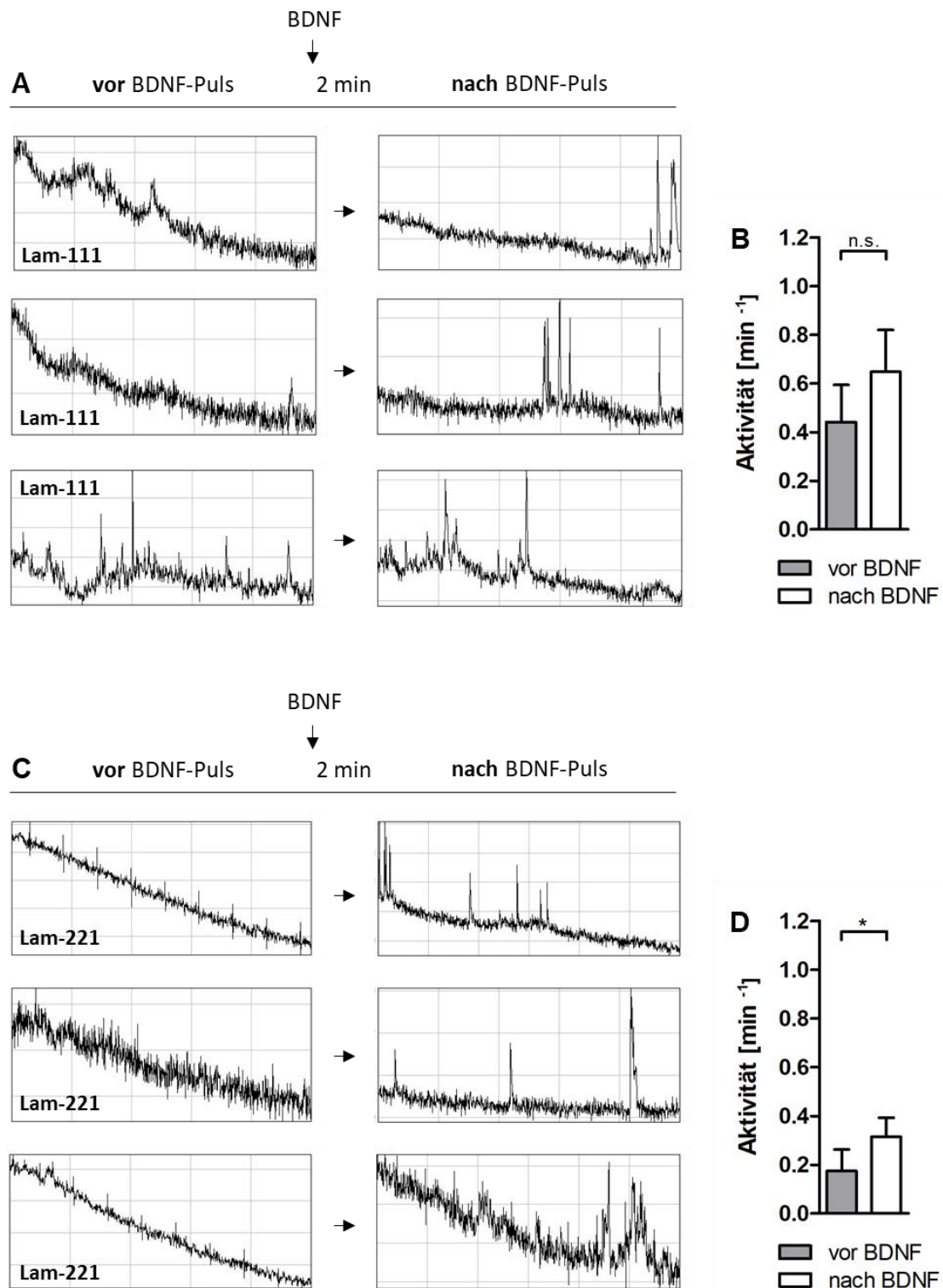
**Abbildung 14: Spontane Kalziumeinströme an Motoneuronen aus dem *trkB*<sup>TK-/-</sup> Mausmodell und unter BDNF, CNTF und GDNF bei wildtypischen Motoneuronen**  
 A, B: Beispielbilder der spontanen Kalziumtransienten beim *trkB*<sup>TK-/-</sup> Wildtyp (A) und der *trkB*<sup>TK-/-</sup> Mutante (B); C, D: Quantifizierung der Transientenfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte gegeneinander (C) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (D) bei Motoneuronen aus dem *trkB*<sup>TK-/-</sup> Mausmodell. E-G: Beispielbilder der Kalziumtransienten bei wildtypischen Motoneuronen mit BDNF (E), CNTF (F), und GDNF (G). H, I: Quantifizierung der Transientenfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte gegeneinander (H) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (I) im Vergleich der neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF bei wildtypischen Motoneuronen. \* Signifikanz <0,05

### **5.2.3 Spontane Kalziumtransienten nach akuter Applikation von BDNF**

Im Anschluss an die Langzeit-Exposition wurde untersucht, welche Wirkung der neurotrophe Faktor BDNF bei akuter Applikation auf die Kalziumtransienten am Wachstumskegel hat. Die Inkubationszeit zwischen der Applikation von BDNF und der Messung der Transientenfrequenz betrug 2 Minuten. Eine quantitative Summenanalyse bei wildtypischen Motoneuronen ergab einen Anstieg der Transientenfrequenz nach akuter Applikation von BDNF um fast das Doppelte. Nach der Gabe von BDNF kam es entsprechend dieser Daten sowohl auf Laminin-111 (Abbildung 15A) als auch auf Laminin-221/211 (Abbildung 15B) in der Mehrheit der Wachstumskegel zu einem Anstieg der Kalziumtransienten. Der rasche Anstieg der Kalziumeinströme lässt darauf schließen, dass der Signalweg von BDNF am ehesten durch lokale Mechanismen vermittelt wird und dass spontane Kalziumtransienten in diesem Signalweg eine Rolle spielen könnten.

Zusammenfassend zeigte sich von den drei neurotrophen Faktoren, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Motoneurone haben, nur unter BDNF ein Anstieg lokaler Kalziumströme am Wachstumskegel. Der Einfluss von BDNF auf die Kalziumtransienten zeigte sich sowohl unter Langzeitbehandlung als auch nach akuter Applikation. Fehlt der Rezeptor für BDNF, sind die Kalziumeinströme erniedrigt.





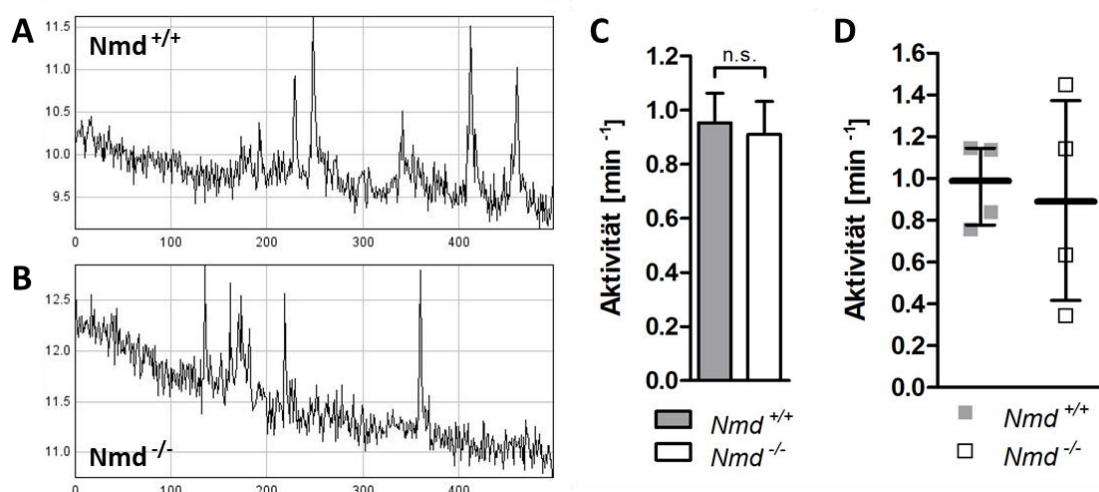
**Abbildung 15: Akute Applikation des neurotrophen Faktors BDNF**

Kalziumtransienten jeweils eines Wachstumskegels vor (links) und nach (rechts) BDNF Applikation auf Laminin-111(A) und Laminin-221/211(C). B, D: Quantifizierung; Lam-111 = Laminin-111, Lam-221 = Laminin-221/211, \* Signifikanz  $<0,05$ , n.s. = nicht signifikant

### 5.3 Spontane Kalziumtransienten in Motoneuronen aus dem $Nmd^{2J}$ Mausmodell

Um zu klären, ob der Defekt bei der SMARD1 wie bei der proximalen SMA vom Wachstumskegel ausgeht, wurden die Kalziumtransienten am Wachstumskegel bei wildtypischen Motoneuronen und bei Motoneuronen eines SMARD1 Mausmodells bestimmt. Durch die Messung spontaner Kalziumeinströme konnte so auf die Aktivität am Wachstumskegel rückgeschlossen werden.

Die Messungen der Kalziumströme zeigen, dass sich Motoneurone aus dem  $Nmd^{2J}$  Mausmodell, verglichen mit wildtypischen Motoneuronen, nicht in der Frequenz ihrer Kalziumeinströme am Wachstumskegel unterscheiden.



**Abbildung 16: Kalziumtransienten an den Wachstumskegeln von Motoneuronen aus dem  $Nmd^{2J}$  Mausmodell**

A, B: Beispielbilder der spontanen Kalziumtransienten beim Wildtyp (A) und bei Motoneuronen des  $Nmd^{2J}$  Mausmodells. C, D: Quantifizierung der Aktionsfrequenz als Mittelwert aller Einzelwerte (C) und als Mittel aller durchgeführten Versuche (D), grauer Balken = Wildtyp, weißer Balken =  $Nmd^{2J}$  Mutante,  $Nmd^{+/+}$  = Wildtyp,  $Nmd^{-/-}$  = Mutante.

## 6. Diskussion

### 6.1 Die Wirkung von R-Roscovitine auf die Entwicklung der SMA-Motoneurone

Ziele dieser Arbeit waren die Untersuchungen von spontanen Kalziumtransienten in wildtypischen Motoneuronen, in Smn-defizienten Motoneuronen und in primären Motoneuronen eines SMARD1 Mausmodells.

Primäre murine Smn-defiziente Motoneurone zeigen eine reduzierte Frequenz spontaner Kalziumeinströme während einer Kulturdauer von 5 Tagen auf einer synapsen-spezifischen Laminin-Isoform (Laminin-221) und in Gegenwart der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF. Die Reduktion der spontanen Kalziumeinströme geht einher mit einer verminderten Cav2.2 Cluster Formation. Somit haben wir uns die Frage gestellt, ob der Kalziumkanal Agonist R-Roscovitine, der die Kalziumkanäle länger offenhält, dem verminderten Clustering entgegenwirken könnte.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass R-Roscovitine die Frequenz der spontanen Kalziumeinströme am distalen Axon erhöht und gleichzeitig die zelluläre Differenzierung an den SMA-Motoneuronen positiv beeinflusst.

Bei SMA-Motoneuronen liegt ein Differenzierungsdefekt der neuromuskulären Endplatte vor (Jablonka & Sendtner; 2017). Grundlage dieser Annahme sind die strukturellen Veränderungen der SMA-Motoneurone in Bezug auf die Morphologie der Wachstumskegel und deren Axonlängen (Rossoll *et al.*, 2003; Jablonka *et al.*, 2007). Die bei Rossoll *et al.* nachgewiesenen kürzeren Axonlängen auf Laminin-111 und die reduzierte Menge an  $\beta$ -Aktin bei SMA-Motoneuronen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 8E, F und Abbildung 9D, E). Jablonka *et al.* haben gezeigt, dass die Akkumulation der Cav2.2 Kalziumkanäle bei SMA-Motoneuronen reduziert ist. Auch in dieser Arbeit wurde eine reduzierte Menge des Cav2.2 Proteins im Wachstumskegel der SMA-Motoneurone festgestellt (Abbildung 9A, B). Laut Jablonka *et al.* liegt das gestörte Cav2.2 Clustering einer reduzierten Interaktion der Cav-Domäne mit der  $\beta$ 2-Kette des synapsen-spezifischen Laminin-221/211 zu Grunde. Daraus resultiert, dass das von Laminin-221/211 ausgehende Differenzierungssignal – der spontane

Kalziumeinstrom – nicht an die Motoneuronen weitergegeben werden kann, woraufhin sich die Differenzierung der SMA-Motoneuronen verzögert. Als morphologisches Korrelat zeigen sich längere Axone der SMA-Motoneurone auf Laminin-221/211 im Vergleich zum Wildtyp. Die verlängerten Axone der SMA-Motoneurone auf Laminin-221/211 konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abbildung 8G, H).

Die hier durchgeführten Experimente zeigen zum ersten Mal, dass der  $Ca_v2.2$  Kalziumkanalagonist R-Roscovitine zu einer Verbesserung der funktionellen Defizite bei Smn-defizienten Motoneuronen führt. In Folge der Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle am Wachstumskegel kommt es zu lokalen Kalziumeinströmen und durch den Kalziumanstieg zur Vesikelfreisetzung (Cohan et al., 1987; Fields et al., 1990). Die Kalziumeinströme sind über diesen Mechanismus verantwortlich für den Wachstumsstopp des Axons und die Einleitung der Differenzierung des Wachstumskegels (Gu et al., 1994; Gu et al., 1995). Nur wenn die Kalziumkanäle in Cluster zusammenlagern, ist der Kalziumeinstrom für die Signalweiterleitung ausreichend (Connor et al., 1990). Es wurde gezeigt, dass die Clusterbildung der Kalziumkanäle bei SMA-Motoneuronen gestört ist und dass dadurch auch die Frequenz der Kalziumeinströme sinkt, die für die Einleitung der Wachstumskegel-Differenzierung benötigt wird (Jablonka et al., 2007). In dieser Arbeit wurden ebenfalls niedrigere Kalziumtransienten bei SMA Motoneuronen beobachtet (Abbildung 10A, B). Zudem konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Gabe von R-Roscovitine den Kalziumeinstrom an den Wachstumskegeln der SMA-Motoneurone verbessert und somit auch die Frequenz der Kalziumtransienten erhöht (Abbildung 10E, F).

Neben den funktionellen Einschränkungen weisen Smn-defiziente Motoneurone auch strukturelle Defizite auf, die sich durch die kontinuierliche Behandlung mit R-Roscovitine verbessern lassen. Unter R-Roscovitine sind die Axone auf Laminin-111 verlängert und auf Laminin-221/211 verkürzt (Abbildung 8). Das Verhalten der Axonlängen unter Roscovitine Behandlung entspricht damit wildtypischen Motoneuronen und zeigt eine verbesserte Differenzierung der SMA-Motoneurone an. Auch die Menge von  $\beta$ -Aktin und  $Ca_v2.2$  ist unter R-

Roscovitine erhöht (Abbildung 9). Die Defizite der untersuchten Parameter ließen sich in einem solchen Ausmaß von R-Roscovitine beeinflussen, dass sie sich nicht mehr von wildtypischen Werten unterscheiden. Dabei ist nicht nur die Gesamtintensität zunehmend, es zeigen sich auch vermehrt Areale mit kräftigerem Signal. Diese könnten eine größere Zusammenlagerung einzelner Kanäle darstellen, was ein Hinweis auf eine verbesserte Clusterbildung unter dem Einfluss von R-Roscovitine sein könnte.

Zusammenfassend wird durch den  $Ca_v2.2$  Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine die Differenzierung der SMA-Motoneurone verbessert, indem die Erregbarkeit am Wachstumskegel ansteigt. Dieser positive Effekt auf die Entwicklung der SMA-Motoneurone zeigt sich sowohl strukturell bei den Axonlängen und Wachstumskegeln, als auch funktionell mit einer erhöhten Transientenfrequenz spontaner Kalziumeinströme. In Tejero *et al.* (unveröffentlichte Daten) konnte außerdem gezeigt werden, dass der Roscovitine-Effekt nicht nur auf zellulärer Ebene erfolgsversprechend ist, sondern auch elektrophysiologisch an Nerv-Muskelpräparaten Wirkung zeigt. Schließlich konnte bei Tejero *et al.* nachgewiesen werden, dass die *in vivo* Gabe von R-Roscovitine auch zu einer Prognoseverbesserung behandelter SMA Mäuse führt (unveröffentlichte Daten).

## **6.2 Der Wirkmechanismus von R-Roscovitine auf zellulärer Ebene**

### *Agonismus am $Ca_v2.2$ Kalziumkanal*

Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle liegen in mehreren *geschlossen-* und *offen-*Zuständen vor (Lee & Elmslie, 1999; Buraei *et al.*, 2005). Durch die Bindung von R-Roscovitine an den offenen Zustand der  $Ca_v2$  Kalziumkanäle verzögert sich der Übergang des Kanals in einen geschlossenen Zustand um das drei- bis sechsfache (Yan *et al.*, 2002). Aus der verzögerten Kanalschließung folgt eine Zunahme des Kalziumeinstroms und eine gesteigerte Vesikelfreisetzung von etwa 150% an dieser Stelle (Cho & Meriney, 2006). Der Effekt von R-Roscovitine kennzeichnet sich dabei als rasch (<2 sec), reversibel und dosisabhängig (Yan *et al.*, 2002). Zudem ist die Wirkung an den Kalziumkanälen spezifisch für R-Roscovitine und kann nicht durch die Gabe des Stereoisomers S-Roscovitines

hervorgerufen werden (Buraei *et al.*, 2005; Cho & Meriney, 2006). Aus dieser Kinetik lässt sich schließen, dass die gesteigerte Vesikelfreisetzung über den plötzlich einsetzenden, höheren Kalziumstrom nur dann Sinn macht, wenn die Bindungsstelle von R-Roscovitine direkt am Kanal liegt und nicht über einen alternativen, intrazellulären Signalweg hervorgerufen wird. In Tejero *et al.* konnte gezeigt werden, dass die akute Applikation von R-Roscovitine auch bei Motoneuronen innerhalb weniger Sekunden zu einem Kalziumstrom führt, was die rasche Wirkung von R-Roscovitine bestätigt (unveröffentlichte Daten). Die in dieser Arbeit durchgeführten *Calcium Imaging* Experimente zeigen zudem, dass sich der positive Effekt von R-Roscovitine bei SMA-Motoneuronen durch die gleichzeitige Gabe des Kalziumkanalantagonisten  $\omega$ -Conotoxin aufheben lässt (Abbildung 11). Es wird angenommen, dass durch die Gabe von  $\omega$ -Conotoxin die Bindungsstelle für R-Roscovitine am Kalziumkanal blockiert wird. Der Einfluss von  $\omega$ -Conotoxin hat dabei aber nicht nur direkte Auswirkungen auf den Kalziumstrom, sondern zeigt sich auch indirekt anhand zellmorphologischer Parameter: Bei gleichzeitiger Gabe von R-Roscovitine und  $\omega$ -Conotoxin geht der positive Effekt von R-Roscovitine auf die Axonlängen der SMA-Motoneurone verloren (Abbildung 8F, H).

Präparate von Mäusen, die einen Knockout des p35 Proteins aufweisen, zeigen unter der Gabe von R-Roscovitine weiterhin hohe Kalziumtransienten (Yan *et al.*, 2002). Das p35 Protein gilt als entscheidender Bindungspartner und gleichzeitig als Aktivator von Cdk5. Die extrazelluläre Bindung von R-Roscovitine an den Cav2.2 Kalziumkanal bleibt also von Cdk5/p35 unbeeinflusst (Yan *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit erfolgte ergänzend zu den Daten von Yan *et al.* die Untersuchung der Kalziumtransienten bei Mäusen mit einem Cdk5 Knockout. Motoneurone un behandelter Mäuse mit Cdk5 Knockout weisen keine Unterschiede bezüglich der Kalziumtransienten in den Wachstumskegeln auf. Es ist daher davon auszugehen, dass sich ein Cdk5 Knockout nicht auf die Kalziumeströme an den Wachstumskegeln der Motoneurone auswirkt (Abbildung 13). Unter R-Roscovitine Behandlung zeigt sich sowohl bei den wildtypischen Motoneuronen als auch bei Motoneuronen aus dem Cdk5 Knockout Mausmodell ein nicht signifikanter Anstieg der Transientenfrequenz

(Abbildung 13). Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeit von Yan *et al.* Der Effekt von R-Roscovitine am Kalziumkanal bleibt trotz fehlendem Cdk5-Protein erhalten.

Gegen die alleinige Wirkung von R-Roscovitine auf die Cav2 Kalziumkanäle spricht, dass für eine agonistische Wirkung am Kalziumkanal eine etwa 300-fach höhere Konzentration benötigt wird, als für eine antagonistische Wirkung an Cdk5 ( $EC_{50}[Cav2.2] = 54 \mu M$ ;  $IC_{50}[Cdk5] = 0,16 \mu M$ ) (Buraei *et al.*, 2005). Außerdem ist Roscovitine als niedermolekulare, lipophile Substanz in der Lage, die Zellmembran zu passieren und könnte somit auch innerhalb kürzester Zeit intrazelluläre Signalwege beeinflussen. Einen statistisch zwar nicht signifikanten aber dennoch erwähnenswerten Effekt auf die Kalziumtransienten zeigt sich außerdem unter der Behandlung mit S-Roscovitine (Abbildung 10 D, E, F). Eine agonistische Wirkung von S-Roscovitine am Cav2 Kalziumkanal erfordert eine 20-fach höhere Konzentration als R-Roscovitine (Buraei & Elmslie, 2008). Es ist daher unwahrscheinlich, dass der Anstieg der Kalziumtransienten unter S-Roscovitine in einer direkten Bindung am Kalziumkanal begründet liegt.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die erhöhten Kalziumtransienten unter der Behandlung mit R-Roscovitine durch eine direkte Bindung von R-Roscovitine an die Cav2 Kalziumkanäle verursacht werden. Argumente, die diese These unterstützen, sind die schnelle und reversible Wirkung von R-Roscovitine, sowie die Aufhebung des R-Roscovitine Effekts bei gleichzeitiger Gabe des Cav2 Antagonisten  $\omega$ -Conotoxin. Für den alternativen Signalweg über die Inhibition von Cdk5 spricht vor allem der geringe, nicht-signifikante Anstieg der Kalziumtransienten unter S-Roscovitine.

#### *Antagonismus an der Cyclin-abhängigen Kinase 5*

Die Cyclin-abhängige Kinase 5 und deren Untereinheit p35 werden überwiegend in neuronalem Gewebe exprimiert und greifen dort in verschiedene Signalwege ein. In zahlreichen Arbeiten wurde eine Rolle von Cdk5 bei Lernprozessen und synaptischer Plastizität beschrieben (siehe Review von Angelo *et al.*, 2006). Eine weitere wichtige Funktion bildet die Interaktion zwischen Cdk5 und dem

Zytoskelett (Hellmich *et al.*, 1992; Ohshima *et al.*, 1996). Cdk5 ist also prinzipiell ein guter Kandidat, wenn es darum geht, den Wachstumskegel und den axonalen Transport zu beeinflussen. Beides ist in SMA-Motoneuronen gestört (Rossoll *et al.*, 2003; Jablonka *et al.*, 2007) und beides wird von R-Roscovitine positiv beeinflusst (Ergebnisteil). Sowohl R- als auch S-Roscovitine binden kompetitiv und hochspezifisch an die ATP Bindungstasche von Cdk5 und inhibieren diese durch die Blockade der katalytischen Einheit (Vesely *et al.*, 1994; Schulze-Gahmen *et al.*, 1995; De Azevedo *et al.*, 1997; Filgueira de Azevedo *et al.*, 2002). Um die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf den Wirkmechanismus von R-Roscovitine an SMA Motoneuronen sinnvoll zu beurteilen, ist es also notwendig, den antagonistischen Effekt an Cdk5 und den agonistischen Effekt an den Ca<sub>v</sub>2 Kalziumkanälen einander gegenüberzustellen.

In den ersten Arbeiten über Cdk5 gab es Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Cdk5 das neuronale Überleben und den axonalen Transport fördert. So konnte gezeigt werden, dass sich Motoneurone ohne Cdk5 in ihrer Form verändern und sich deshalb die Überlebenszeit der Motoneurone verkürzt (Dhavan & Tsai, 2001). Zudem wurde beschrieben, dass Cdk5 das Transportprotein Aktin im Wachstumskegel durch Phosphorylierung stabilisiert (Nikolic *et al.*, 1996; Matsubara *et al.*, 1996). Ähnliche Effekte zeigen sich mit anderen Transport- und Matrixproteinen (Pigino *et al.*, 1997; Paglini *et al.*, 1998). Wird Cdk5 gehemmt, resultiert daraus die Destabilisierung des axonalen Transports und in der Folge eine Verkürzung der Axone (Nikolic *et al.*, 1996; Pigino *et al.*, 1997). Die Gabe von R-Roscovitine als Cdk5 Inhibitor müsste also entsprechend dieser Vorarbeiten auch bei SMA Motoneuronen zu kürzeren Axonen führen oder diese zumindest nicht verbessern. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. R-Roscovitine führt zu einer Verlängerung der Axone auf Laminin-111, also einem verbesserten axonalen Wachstum (Abbildung 8E, F). Dies bedeutet, dass die positive Wirkung von R-Roscovitine auf die Axonlängen über einen anderen Mechanismus als über die Hemmung von Cdk5 stattfinden muss. Werden die SMA Motoneurone mit GV-58, einem alleinigen Ca<sub>v</sub>2 Agonisten ohne Cdk5-inhibitorischer Komponente behandelt, steigen die Axonlängen der SMA Motoneurone signifikant an, während sich unter der Behandlung mit S-



Roscovitine, einem alleinigen Cdk5 Inhibitor, keine Wirkung zeigt (Abbildung 8E). Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass die positive Wirkung auf die Axonlängen der SMA Motoneurone am ehesten durch eine agonistische Wirkung am Kalziumkanal bedingt ist und nicht durch eine Cdk5 Blockade.

Der *in vitro* eindeutig erscheinende Zusammenhang zwischen hoher Cdk5 Aktivität und Neuritenwachstum lässt sich jedoch *in vivo* nicht so einfach bestätigen. *In vivo* scheint Cdk5 eher eine regulatorische Funktion aufzuweisen, indem es die Richtung des Axonwachstums steuert, wobei unklar ist, ob es dafür aktiviert oder inhibiert werden muss (Connell-Crowley *et al.*, 2000). Der Aussage, dass eine Cdk5 Aktivierung pauschal zu einem längeren Axonwachstum führt, wird entgegengesetzt, dass Cdk5 durch eine Phosphorylierung von Pak1 zu einer geringeren Aktinpolymerisation führt, was eher eine Neuritenretraktion zur Folge hätte als ein verbessertes Axonwachstum (Nikolic *et al.*, 1998). Um diesen Aspekt zu berücksichtigen wurde in der Arbeit von Tejero *et al.* (unveröffentlichte Daten) zusätzlich getestet, ob eine Behandlung mit R-Roscovitine Auswirkungen auf die Phosphorylierung von Pak1 bei SMA-Motoneuronen hat. Es zeigten sich unter R-Roscovitine weder Unterschiede in der Proteinmenge von unphosphoryliertem noch von phosphoryliertem Pak1 (Datenerhebung Nikolaos Zapantis). Die Gabe von R-Roscovitine scheint demnach keinen Einfluss auf die Aktivität von Cdk5 zu haben.

Neben dem Einfluss auf das Überleben und den axonalen Transport konnte in Tejero *et al.* nachgewiesen werden, dass die Vesikelfreisetzung (Berechnung als *quantal content*) am Nerv-Muskelpräparat von SMA Mäusen unter der Gabe von R-Roscovitine zunimmt (unveröffentlichte Daten). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Aktivierung von Cdk5 eine Phosphorylierung des Munc18/Syntaxin-Komplexes zur Folge hat, wodurch die Vesikelfreisetzung steigt (Fletcher *et al.*, 1999). Würde die Wirkung von R-Roscovitine ausschließlich über eine Cdk5 Inhibition erfolgen, müsste anhand dieser Daten die Vesikelfreisetzung unter R-Roscovitine sinken und nicht, wie bei Tejero *et al.* (unveröffentlichte Daten) nachgewiesen, steigen. Bezüglich der Vesikelfreisetzung existieren jedoch Unstimmigkeiten. So wurde in einer anderen Arbeit postuliert, dass eine

Phosphorylierung von Munc-18/Syntaxin 1A durch eine aktivierte Cdk5 zu einer reduzierten Vesikelfreisetzung führt, weil phosphoryliertes Munc-18/Syntaxin 1A weniger mit anderen synaptischen Proteinen interagiert (Shuang *et al.*, 1998). Die Aussage von Shuang *et al.* macht es im Gegensatz zur Aussage von Fletcher *et al.* also vorstellbar, dass die Inhibition von Cdk5 die Vesikelfreisetzung nicht verringert, sondern sogar verbessern könnte. Diese Aussage wird unterstützt durch die Ergebnisse von Kim *et al.* Dort führte die Inhibition von CDK5 dazu, dass „stille“ Synapsen demaskiert wurden, wodurch der Vesikel-Reservepool mobilisiert wurde, was wiederum zu einer Verbesserung der Vesikelfreisetzung führte (Kim *et al.*, 2010).

Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft die direkte Interaktion zwischen Cdk5 und den Kalziumkanälen. Wird Cdk5 durch seine Untereinheit p35 aktiviert, ist es in der Lage, die Ca<sub>v</sub>2 Kalziumkanäle an der  $\alpha$ 1-Untereinheit zu phosphorylieren (Tomizawa *et al.*, 2002). Diese Phosphorylierung bewirkt, dass die Interaktion zwischen dem Kalziumkanal und den SNARE Proteinen verhindert wird und sich die Vesikelfreisetzung so reduziert (Tomizawa *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Cdk5 hätte also auch in diesem Fall eine verringerte Vesikelfreisetzung zur Folge und eine Blockade von Cdk5 würde demzufolge auch hier die Freisetzung der Vesikel verbessern. Anhand der vorliegenden Daten kann also nicht ausgeschlossen werden, dass R-Roscovitine über den Mechanismus einer Cdk5 Inhibition zu einer gesteigerten Vesikelfreisetzung führt.

Wird die Rolle von Cdk5 bei der neuronalen Entwicklung betrachtet, so ergibt sich folgendes Fazit: *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass eine hohe Cdk5 Aktivität das Wachstum und die Differenzierung neuronaler Zellen im Axon und am Wachstumskegel fördert. Würde R-Roscovitine bei den SMA Mäusen über eine Cdk5-Inhibition wirken, müssten sich die zell-morphologischen Parameter demzufolge verschlechtern. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigen jedoch eine Verbesserung der zell-morphologischen Parameter. Dies bedeutet, dass der Wirkmechanismus von R-Roscovitine nicht über eine Cdk5 Inhibition stattfinden kann, sondern über einen anderen Signalweg. Dieser Signalweg bezieht sich am ehesten auf die Kalziumkanäle.

In Bezug auf die Vesikelfreisetzung kann keine eindeutige Aussage über den Wirkmechanismus von R-Roscovitine getroffen werden. Es gibt sowohl Hinweise, dass die Inhibition von Cdk5 die Vesikelfreisetzung verbessert (Shuang *et al.*, 1998; Tomizawa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010) als auch Hinweise, dass die Inhibition von Cdk5 die Vesikelfreisetzung verschlechtert (Fletcher *et al.*, 1999).

### *Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen*

Zahlreiche Vorarbeiten über Cdk5 haben ergeben, dass die Funktion der Kinase am ehesten darin liegt, als Regulationsprotein in zelluläre Prozesse wie Transport und Synapsenbildung einzugreifen ohne dass festgelegt ist, ob dafür eine Aktivierung oder eine Hemmung der Kinase nötig ist. Fest steht aber, dass es sowohl schädlich ist, wenn Cdk5 fehlt, als auch wenn die Kinase überaktiv ist (Dhavan & Tsai, 2001; Cruz & Tsai, 2004). Bei einer Überaktivierung von Cdk5 kommt es zur Hyperphosphorylierung von Zellproteinen. Diese können im Anschluss akkumulieren, was wiederum zur Pathogenese neurodegenerativer Erkrankung beiträgt (Cruz & Tsai, 2004). Ein bekanntes Beispiel ist das Protein Tau bei der Alzheimer Erkrankung. Wird Tau von Cdk5 hyperphosphoryliert, löst es sich von den Mikrotubuli ab und akkumuliert in der Nervenzelle, was schließlich zur Zytoskelettdisruption und zum Zelluntergang führt (Ishiguro *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1993; Mandelkow, 1999; Patrick *et al.*, 1999). Eine Tau Hyperphosphorylierung durch Cdk5 konnte auch in SMA Mausmodellen nachgewiesen werden (Miller *et al.*, 2015). Verschiedene Doppel-Knockout Mausmodelle konnten zeigen, dass bei der SMA die Hyperphosphorylierung von Tau durch Cdk5 zur Denervierung der neuromuskulären Endplatte und schließlich auch zur Degeneration der Motoneuronen führt (Miller *et al.*, 2015). Eine Behandlung mit Roscovitine würde demzufolge die Hyperphosphorylierung reduzieren und könnte die Degeneration der SMA Motoneurone über die Inhibition von Cdk5 verhindern. In einem Mausmodell für die Niemann-Pick Erkrankung, einer rezessiv vererbten Speicherkrankheit, kommt es ebenfalls durch eine Cdk5-induzierte Hyperphosphorylierung zur Akkumulation von Bestandteilen des Zytoskeletts (Zhang *et al.*, 2004). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Roscovitine über

eine Inhibition von Cdk5 die Hyperphosphorylierung der Zytoskelettproteine verringert und sich dadurch die motorische Funktion der Niemann-Pick Mäuse verbessert (Zhang *et al.*, 2004). Bei der Amyotrophen Lateralsklerose wurde hyperphosphoryliertes Neurofilament nachgewiesen (Shelton & Johnson, 2004). Es existieren jedoch widersprüchliche Aussagen, in wie weit Cdk5 für die Phosphorylierungen bei der ALS verantwortlich ist (Dhavan & Tsai, 2001; Shelton & Johnson, 2004; Takahashi & Kulkarni, 2004).

Für den Einfluss von Kalziumkanälen bei Motoneuronerkrankungen existiert weniger Evidenz. Bei Patienten mit ALS wurden Autoantikörper gegen Ca<sub>v</sub>2 Kanäle gefunden, die möglicherweise bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle spielen (Day *et al.*, 1997). Zudem zeigen Mausmodelle mit Störungen an Kalziumkanälen ähnliche klinische Auffälligkeiten wie Mäuse aus dem SMA Modell (Rodríguez-Santiago *et al.*, 2007). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Kalziumkanäle als pathophysiologische Ursache bei Erkrankungen mit motorischen Beeinträchtigungen wie bei der SMA in Frage kommen.

Um zu klären, ob der Wirkmechanismus von R-Roscovitine über die Kalziumkanäle oder über Cdk5 stattfindet, wurden in Tejero *et al.* trächtige SMN-heterozygote Mäuse subkutan mit R-Roscovitine oder mit S-Roscovitine behandelt (unveröffentlichte Daten). Es zeigte sich, dass das Überleben der homozygoten SMA Jungtiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant anstieg, wenn sie intrauterin mit R-Roscovitine behandelt wurden, während sich das Überleben unter S-Roscovitine nicht verbesserte. Diese zusätzlichen *in vivo* Daten machen neben den zell-morphologischen und den funktionellen Aspekten einen Wirkmechanismus über die Ca<sub>v</sub>2 Kalziumkanäle wahrscheinlicher als über Cdk5.

Zusammengefasst sprechen einige Aspekte dafür, dass eine Überaktivität von Cdk5 zur Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen beiträgt. Da es sich bei der SMA um eine Degeneration der Motoneurone handelt, sind auch hier gestörte Signalwege über Cdk5 denkbar. Dementsprechend würde es passen, dass R-Roscovitine als Cdk5 Inhibitor diese Signalwege hemmt und somit das Überleben im Mausmodell verbessern könnte. Andererseits wurde in der Literatur

beschrieben, dass die Degeneration der Motoneurone bei der SMA vom Wachstumskegel ausgeht und nach proximal voranschreitet (Jablonka *et al.*, 2007). Es erscheint daher wahrscheinlicher, auch in Anbetracht der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse, dass die R-Roscovitine Wirkung durch einen lokal erhöhten Kalziumeinstrom am Wachstumskegel zustande kommt. Dafür spricht vor allem, dass eine direkte Bindungsstelle von R-Roscovitine an einem Kalziumkanal im Wachstumskegel vorliegt, der für die Entwicklung des Motoneurons eine essentielle Bedeutung hat und dass die Bindung von R-Roscovitine an diesen Kanal zu einer schnellen und gut reproduzierbaren Erhöhung der lokalen Kalziumtransienten führt. Da insbesondere die Clusterbildung dieser Kalziumkanäle und die damit im Zusammenhang stehenden insuffizienten Kalziumeinströme für den Differenzierungsdefekt der Motoneurone bei der SMA verantwortlich scheinen, klingt es insgesamt plausibel, dass die positive Wirkung von R-Roscovitine über den Kalziumkanal stattfindet und nicht über die Inhibition von Cdk5.

### **6.3 Der indirekte Einfluss neurotropher Faktoren auf den $Ca_v2.2$ Kalziumkanal**

Für die neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF ist beschrieben, dass sie die Entwicklung von Motoneuronen fördern (Oppenheim *et al.*, 1992; Sendtner *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1992; Arakawa *et al.*, 1990; Sendtner *et al.*, 1990; Henderson *et al.*, 1994). Über welchen Mechanismus die jeweiligen Faktoren zur Reifung der Motoneurone beitragen, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass entscheidende Differenzierungssignale vom Wachstumskegel ausgehen und dass diese Signale häufig mit lokal erhöhten Kalziumeinströmen in Verbindung stehen (McAllister *et al.*, 1996; Spitzer, 2006). Neben der Untersuchung des Kalziumkanalagonisten bei primären Smn-defizienten Motoneuronen war es also ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob die neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF über lokale Kalziumeinströme am Wachstumskegel zur Motoneuronentwicklung beitragen. Abbildung 14 E-I zeigt, dass nur die kontinuierliche Gabe von BDNF

zu einer signifikant erhöhten Frequenz von Kalziumtransienten am Wachstumskegel führt.

Für BDNF ist eine wichtige Rolle bei der Synapsenbildung und Vesikelfreisetzung von Neuronen beschrieben (Blum & Konnerth, 2005). Ein Zusammenhang mit Kalziumeinströmen war bisher jedoch nur bei kortikalen Neuronen im Rahmen der Langzeitpotenzierung bekannt (Amaral & Pozzo-Miller, 2007). Bei Hippocampusneuronen führt BDNF lokal und unabhängig von NMDA-Rezeptoren zu einem intrazellulären Kalziumeinstrom (Amaral & Pozzo-Miller, 2007). Die durch BDNF initiierten Kalziumströme wurden begleitet von intrazellulären Signalkaskaden, wie der Aktivierung von MAP-Kinasen oder IP3 (Amaral & Pozzo-Miller, 2007; Nakata *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 1999).

Bisher wurde nur ein Zusammenhang zwischen BDNF und dem Nav1.9 Natriumkanal am Wachstumskegel festgestellt (Blum *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass bei Motoneuronen eine Verbindung zwischen BDNF und den Kalziumkanälen am Wachstumskegel existiert. In Motoneuronen aus einem TrkB Knockout Mausmodell (Ntrk) sind die Kalziumeinströme am Wachstumskegel deutlich reduziert (Abbildung 14 A-D). In Dombert *et al.*, wurde zudem gezeigt, dass Motoneurone aus dem Ntrk Mausmodell auch gestörte Axonlängen und Wachstumskegel aufweisen (Dombert *et al.*, 2017). Wird also der Signalweg von BDNF unterbrochen, resultiert daraus sowohl morphologisch als auch funktionell eine gestörte Entwicklung des Motoneuronwachstumskegels.

Bisher wurde keine direkte Interaktion zwischen BDNF und den Kalziumkanälen am Wachstumskegel der Motoneurone festgestellt. Die in dieser Arbeit durchgeführte akute Applikation von BDNF (Abbildung 15) zeigt jedoch, dass der Einfluss von BDNF in einer kurzen Zeitspanne zu vermehrten Kalziumeinströmen an der Zellmembran des Wachstumskegels führt und ein lokaler Zusammenhang mit den Kalziumkanälen wahrscheinlich ist. Außerdem zeigt sich in immunzytochemischen Untersuchungen, dass TrkB eine ähnliche Verteilung im Wachstumskegel aufweist wie Cav2.2 (Dombert *et al.*, 2017). Um eine genauere Lokalisierung beider Proteine beschreiben zu können, müssten allerdings hoch-

auflösendere Mikroskopietechniken wie dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) oder STED (Stimulated Emission Depletion) zum Einsatz kommen.

Die Gabe von BDNF führt nicht nur zu erhöhten Kalziumeinströmen, sondern auch zu einem vermehrten Kalziumkanalclustering und zu einer erhöhten Signalintensität von  $\beta$ -Aktin, was wiederum die Fläche des Wachstumskegels erhöht (Yao *et al.*, 2006; Torres-Benito *et al.*, 2011; Dombert *et al.*, 2017). Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, dass durch die Bindung von BDNF an den TrkB Rezeptor intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden, die dazu führen, dass die  $\beta$ -Aktin Präsenz lokal im Wachstumskegel erhöht wird. Mehr F-Aktin korreliert mit einer erhöhten Frequenz an spontanen Kalziumeinströmen basierend auf einer verstärkten Cluster-Bildung. Der Kalziumeinstrom wiederum bewirkt eine Regulierung der axonalen Verlängerung. Sind diese Signalwege gestört, resultiert daraus eine fehlerhafte Entwicklung des Motoneuronenwachstumskegels und der axonalen Elongation. Dabei ähneln sich die Defekte von Motoneuronen aus dem Ntrk Mausmodell und dem SMA Mausmodell *in vitro* (Jablonka *et al.*, 2007). Es scheint daher möglich, dass der BDNF/TrkB Signalweg auch in der Pathogenese der SMA involviert sein könnte oder zumindest einen zellulären Marker darstellt, der das Ausmaß des Motoneurondefekts andeutet. Neben dem direkten Ansatz an den Kalziumkanälen mit R-Roscovitine ist also auch der BDNF/TrkB Signalweg ein möglicher indirekter Kandidat um die Differenzierungsstörung des Motoneuronwachstumskegels bei der SMA positiv zu beeinflussen.

#### **6.4 Kalziumtransienten an der neuromuskulären Endplatte bei SMARD1**

Im Gegensatz zu SMA Motoneuronen zeigen primäre Motoneuronen aus dem SMARD1 Mausmodell keine Einschränkungen der Kalziumtransientenfrequenz (Abbildung 16). In der Arbeit von Surrey *et al.* 2018 wurden zusätzlich morphologische Parameter bei Nmd<sup>2J</sup> Motoneuronen untersucht. Auch dort zeigten sich keine Auffälligkeiten bezüglich der Axonlänge und der Größe der Wachstumskegel (Surrey *et al.*, 2018). Es ist deshalb davon auszugehen, dass Motoneurone aus dem SMARD1 Mausmodell *in vitro* weder morphologisch, noch

funktionell Ähnlichkeiten mit den Motoneuronen aus dem Mausmodell für die proximale SMA aufweisen. Der Defekt bei der SMARD1 scheint daher im Gegensatz zur SMA nicht vom Wachstumskegel auszugehen. Da keine Erregbarkeitsstörungen an der neuromuskulären Endplatte in Ighmbp2-defizienten Motoneuronen gemessen werden konnten, ist ein Einsatz von R-Roscovitine bei diesem Krankheitsbild nicht zielführend (Krieger *et al.*, 2013).

## **6.5 Die klinische Anwendung der untersuchten Substanz Roscovitine**

### *Pharmakologie*

Die Applikation von Roscovitine erfolgt beim Menschen oral. Nach einer vergleichsweise lang andauernden gastrointestinalen Resorptionszeit beträgt die Bioverfügbarkeit von Roscovitine durch seine geringe Größe annähernd 100% (Mejier & Raymond, 2003). Durch die hydrophobe Struktur weist die Substanz eine hohe Fettverteilung auf (De la Motte & Gianella-Borradori, 2004). Diese bedingt eine kontext-sensitive Halbwertszeit, die konzentrationsabhängig 0,6 bis 5 Stunden beträgt (De la Motte & Gianella-Borradori, 2004; Vita *et al.*, 2004). Roscovitine erreicht beim Erwachsenen eine Liquorgängigkeit von etwa 30%, die jedoch im Embryonalstadium aufgrund der noch durchlässigen Blut-Hirnschranke und dem noch nicht vollständig ausgereiften Cytochrom P450 (CYP450) System weitaus höher liegt (Vita *et al.*, 2005; Butt *et al.*, 1990; Kearns *et al.*, 2003). Die optimale Wirkung wird nach 8 bis 24 Stunden erzielt (Mejier & Raymond, 2003). Als Mindestdosierung werden 200 - 500 mg pro Tag empfohlen mit einer Zielplasmakonzentration von 5 bis 20 µM (Mejier & Raymond, 2003). Die Metabolisierung von Roscovitine erfolgt non-linear über das Cytochrom P450 System (McClue & Stuart, 2008). Die Metabolite sind im Gegensatz zu Roscovitine wasserlöslich und werden zu einem hohen Anteil über die Nieren ausgeschieden (De la Motte & Gianella-Borradori, 2004; Vita *et al.*, 2005).

### *Klinische Studien*

Als potenter Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen wurde Roscovitine bereits in mehreren Studien zur Tumorthherapie getestet. Bei fortgeschrittenen, soliden Tumoren zeigten sich die Tumore unter der Behandlung mit Roscovitine in ihrem



Wachstum stabil. Es zeigte sich jedoch keine Tumorreduktion (Benson *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2013). Neben Tumorerkrankungen wurde Roscovitine auch bei Glomerulonephritiden und Viruserkrankungen getestet (Cicenas *et al.*, 2015; Clough *et al.*, 2002). Ein neuer Ansatz ist der Einsatz von S-Roscovitine als neuroprotektive Therapie beim Schlaganfall (Menn *et al.*, 2010; Rousselet *et al.*, 2018) Aktuelle Studien mit Roscovitine rekrutieren Patienten mit Cystischer Fibrose und der Cushing Erkrankung (NCT02160730, NCT02649751).

Roscovitine wird in niedrigen Dosierungen (400 mg) oral gut toleriert (Haesslein & Jullian, 2002; Benson *et al.*, 2007). Erst in höheren Dosierungen (800 mg) ist mit Nebenwirkungen wie Fatigue und ein Anstieg der Transaminasen zu rechnen, weswegen die sequentielle Gabe empfohlen wird (Benson *et al.*, 2007, Hsieh *et al.* 2009, Le Tourneau *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2013; Tolaney *et al.*, 2016).

## **7. Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Kalziumkanalagonist R-Roscovitine durch einen Anstieg des Kalziumeinstroms zu einer verbesserten Differenzierung bei Smn-defizienten Motoneuronen führt. Es wurde gezeigt, dass sich durch R-Roscovitine die Frequenz der Kalziumtransienten erhöhte und die Axonlängen anstiegen und damit Differenzierung und Funktion bei SMN-defizienten Motoneuronen verbessert werden konnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Differenzierungsdefekt an der neuromuskulären Endplatte bei SMA Motoneuronen durch eine gestörte Funktion spannungsabhängiger Kalziumkanäle mitverursacht sein könnte. Eine gestörte Kalziumhomöostase wurde bereits in mehreren Arbeiten bei der Spinalen Muskelatrophie beschrieben (Biondi *et al.*, 2010; Biondi *et al.*, 2008; Jablonka *et al.*, 2007; Lyon *et al.*, 2013; McGivern *et al.*, 2013; Riessland *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2010; Subramanian *et al.*, 2012). Liegen bei SMN-defizienten Motoneuronen Kalziumkanal-bedingte Erregungsstörungen vor, erscheint die Wiederherstellung der Kalziumhomöostase durch den Einsatz von Kalziumkanalagonisten als sinnvolle, zusätzliche therapeutische Option zusätzlich zu den bereits auf dem Markt existierenden Therapien auf gentechnologischer Basis.

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Zytologischer Aufbau eines primären embryonalen Motoneurons	Seite 13
Abb. 2	Roscovitine	Seite 16
Abb. 3	SMN: Gene, Transkripte und Proteine im gesunden Organismus	Seite 21
Abb. 4	Schematisches Modell des Motoneuron Wachstumskegels	Seite 28
Abb. 5	Genotypisierung des SMA Mausmodells	Seite 40
Abb. 6	Konzentrationsreihen mit R- und S-Roscovitine	Seite 47
Abb. 7	Überlebensraten wildtypischer Motoneurone ohne BDNF und CNTF	Seite 48
Abb. 8	Der Effekt von R-Roscovitine, S-Roscovitine, $\omega$ -Conotoxin und GV-58 auf die Axonlängen von SMA-Motoneuronen	Seite 51
Abb. 9	Cav2.2 und $\beta$ -Aktin am Wachstumskegel von SMA-Motoneuronen unter dem Einfluss von R-Roscovitine	Seite 53
Abb. 10	Kalziumtransienten nach einer Langzeitbehandlung mit R- und S-Roscovitine an Motoneuronen aus dem SMA Mausmodell	Seite 56
Abb. 11	Kalziumtransienten nach einer simultanen Behandlung mit R-Roscovitine und $\omega$ -Conotoxin an Motoneuronen aus dem SMA Mausmodell	Seite 58
Abb. 12	Proteinlevel von SMN und Cdk5 nach R-Roscovitine Gabe in SMA Motoneuronen	Seite 59
Abb. 13	Kalziumtransienten unter der Behandlung mit R-Roscovitine an Motoneuronen aus dem Cdk5 Mausmodell	Seite 61
Abb. 14	Spontane Kalziueinströme an Motoneuronen aus dem <i>trkB<sup>TK-/-</sup></i> Mausmodell und unter BDNF, CNTF und GDNF bei wildtypischen Motoneuronen	Seite 63
Abb. 15	Akute Applikation des neurotrophen Faktors BDNF	Seite 65
Abb. 16	Kalziumtransienten an den Wachstumskegeln von Motoneuronen aus dem Nmd <sup>2J</sup> Mausmodell	Seite 66
Tab. 1	Klassifizierung der proximalen spinalen Muskelatrophie	Seite 20
Tab. 2	Verwendete Primärantikörper	Seite 33
Tab. 3	Verwendete Sekundärantikörper	Seite 33
Tab. 4	Konzentrationsreihen mit R- und S-Roscovitine	Seite 48
Tab. 5	Überlebensraten wildtypischer Motoneurone ohne BDNF und CNTF	Seite 49

## 8.2 Literaturverzeichnis

Amaral MD, Pozzo-Miller L (2007) BDNF induces calcium elevations associated with IBDNF, a nonselective cationic current mediated by TRPC channels. *J Neurophysiol.* 98:2476-82

Angelo M, Plattner F, Giese KP (2006) Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory. *J Neurochem.* 99:353-70

Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci.* 10:3507-15

Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND (2004) Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 114:1726-31

Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnicka-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336:417-24

Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C (2007) A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer.* 96:29-37

Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F (2010) In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and

enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 30:11288-99

Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008) Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci.* 28:953-62

Blum R, Kafitz KW, Konnerth A (2002) Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature.* 419:687-93

Blum R, Konnerth A (2005) Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda).* 20:70-8

Bouron A, Soldatov NM, Reuter H (1995) The beta 1-subunit is essential for modulation by protein kinase C of an human and a non-human L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *FEBS Lett.* 377:159-62

Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P (1995) Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet.* 345:694-5

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature.* 344:540-1

Buraei Z, Angheliescu M, Elmslie KS (2005) Slowed N-type calcium channel (CaV2.2) deactivation by the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Biophys J.* 89:1681-91

Buraei Z, Elmslie KS (2008) The separation of antagonist from agonist effects of trisubstituted purines on CaV2.2 (N-type) channels. *J Neurochem.* 105:1450-61

Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Bürglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M (1995) A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet.* 11:335-7

Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* 429:47-62

Catterall WA (1998) Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium.* 24:307-23

Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a003947

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57:411-25

Chang JG, Jong YJ, Huang JM, Wang WS, Yang TY, Chang CP, Chen YJ, Lin SP (1995) Molecular basis of spinal muscular atrophy in Chinese. *Am J Hum Genet.* 57:1503-5

Cho S, Meriney SD (2006) The effects of presynaptic calcium channel modulation by roscovitine on transmitter release at the adult frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci.* 23:3200-8

Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, Stankunas E, Levy J, Meskinyte I, Stankevicius V, Kaupinis A, Valius M (2015) Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med.* 3:135

Clough J (2002) CDK inhibitor shows promise for inflammatory kidney disease. *Drug Discov Today.* 7:789-90

Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 57:805-8

Cohan CS, Connor JA, Kater SB (1987) Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *J Neurosci.* 7:3588-99

Connell-Crowley L, Le Gall M, Vo DJ, Giniger E (2000) The cyclin-dependent kinase Cdk5 controls multiple aspects of axon patterning in vivo. *Curr Biol.* 10:599-602

Connor JA, Kater SB, Cohan C, Fink L (1990) Ca<sup>2+</sup> dynamics in neuronal growth cones: regulation and changing patterns of Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell Calcium.* 11:233-9

Cook SA, Johnson KR, Bronson RT, Davisson MT (1995) Neuromuscular degeneration (nmd): a mutation on mouse chromosome 19 that causes motor neuron degeneration. *Mamm Genome.* 6:187-91

Cox GA, Mahaffey CL, Frankel WN (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron.* 21:1327-37

Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis.* 3:97-110

Cruz JC, Tsai LH (2004) A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 14:390-4

Czeizel A, Hamula J (1989) A hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet.* 26:761-3.

Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*. 253:59-63

Day NC, Wood SJ, Ince PG, Volsen SG, Smith W, Slater CR, Shaw PJ (1997) Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci*. 17:6226-35

De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem*. 243:518-26

De la Motte S, Gianella-Borradori A (2004) Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 42:232-9

Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:749-59

DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res*. 7:339-52

Diers A, Kaczinski M, Grohmann K, Hübner C, Stoltenburg-Didinger G (2005) The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Acta Neuropathol*. 110:289-97

Dombert B, Balk S, Lüningschrör P, Moradi M, Sivadasan R, Saal-Bauernschubert L, Jablonka S (2017) BDNF/trkB Induction of Calcium Transients through Cav2.2 Calcium Channels in Motoneurons Corresponds to F-actin

Assembly and Growth Cone Formation on  $\beta$ 2-Chain Laminin (221). *Front Mol Neurosci.* 10:346

Dominguez E, Marais T, Chatauret N, Benkhelifa-Ziyyat S, Duque S, Ravassard P, Carcenac R, Astord S, Pereira de Moura A, Voit T, Barkats M (2011) Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet.* 20:681-93

Eckart M, Guenther UP, Idkowiak J, Varon R, Grolle B, Boffi P, Van Maldergem L, Hübner C, Schuelke M, von Au K (2012) The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Pediatrics* 129:148-56

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H (1990) Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 5:511-26

Feng L, Wang CY, Jiang H, Oho C, Dugich-Djordjevic M, Mei L, Lu B (1999) Differential signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor in cultured ventral mesencephalic neurons. *Neuroscience.* 93:265-73

Fields RD, Neale EA, Nelson PG (1990) Effects of patterned electrical activity on neurite outgrowth from mouse sensory neurons. *J Neurosci.* 10:2950-64

Filgueira de Azevedo W Jr, Gaspar RT, Canduri F, Camera JC Jr, Freitas da Silveira NJ (2002) Molecular model of cyclin-dependent kinase 5 complexed with roscovitine. *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1154-8

Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzman AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De



Vivo DC; ENDEAR Study Group (2017) Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 377(18):1723-1732

Fletcher AI, Shuang R, Giovannucci DR, Zhang L, Bittner MA, Stuenkel EL (1999) Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18. *J Biol Chem.* 274:4027-35

Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 213:342-8

Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels RJ, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature.* 345:823-5

Glass DJ, Yancopoulos GD (1993) The neurotrophins and their receptors. *Trends Cell Biol.* 3:262-8

Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron.* 73:862-85

Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hübner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet.* 13:2031-42

Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Hübner C (2001) Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding

protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 29:75-7

Grohmann K, Varon R, Stolz P, Schuelke M, Janetzki C, Bertini E, Bushby K, Muntoni F, Ouvrier R, Van Maldergem L, Goemans NM, Lochmüller H, Eichholz S, Adams C, Bosch F, Grattan-Smith P, Navarro C, Neitzel H, Polster T, Topaloğlu H, Steglich C, Guenther UP, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Hübner C (2003) Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Ann Neurol.* 54:719-24

Gu X, Olson EC, Spitzer NC (1994) Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *J Neurosci.* 14:6325-35

Gu X, Spitzer NC (1995) Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. *Nature.* 375:784-7

Haesslein JL, Jullian N (2002) Recent advances in cyclin-dependent kinase inhibition. Purine-based derivatives as anti-cancer agents. Roles and perspectives for the future. *Curr Top Med Chem.* 2:1037-50

Hammarback JA, McCarthy JB, Palm SL, Furcht LT, Letourneau PC (1988) Growth cone guidance by substrate-bound laminin pathways is correlated with neuron-to-pathway adhesivity. *Dev Biol.* 126:29-39

Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature.* 371:513-5

Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF (1992) Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10867-71

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC corrected to Simmons L, Koliatsos VE, Rosenthal A (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*. 266:1062-4

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 9:2459-64

Hsieh WS, Soo R, Peh BK, Loh T, Dong D, Soh D, Wong LS, Green S, Chiao J, Cui CY, Lai YF, Lee SC, Mow B, Soong R, Salto-Tellez M, Goh BC (2009) Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res*. 15:1435-42

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 24:66-70

Hua Y, Krainer AR (2012) Antisense-mediated exon inclusion. *Methods Mol Biol*. 867:307-23

Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR (2008) Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet*. 82:834-48

Hufschmidt A, Lücking CH, Rauer S, Glocker FX (2017) *Neurologie compact*. Thieme Verlag, 7. Auflage. 2.12:393-4

Ibáñez CF, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell TL, Persson H (1992) Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by binding to the trk gene product. *Cell*. 69:329-41

Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Greene LA, Barbacid M, Yancopoulos GD (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*. 10:137-49

Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, Omori A, Takahashi M, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem*. 267:10897-901

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca<sup>2+</sup> channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol*. 179:139-49

Jablonka S, Sendtner M (2017) Developmental regulation of SMN expression: pathophysiological implications and perspectives for therapy development in spinal muscular atrophy. *Gene Ther*. 24:506-513

Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron*. 9:1067-79

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmann BW, Fox GM (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*. 85:1113-24

Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*. 47:545-54

Kaindl AM, Guenther UP, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Zerres K, Schuelke M, Hübner C, von Au K (2008) Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *J Child Neurol*. 23:199-204

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (2013) Principles of neural science. McGraw-Hill Companies. 4.52:1176-82

Katz E, Ferro PA, Weisz G, Uchitel OD (1996) Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *J Physiol.* 497:687-97

Katz E, Protti DA, Ferro PA, Rosato Siri MD, Uchitel OD (1997) Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *Br J Pharmacol.* 121:1531-40

Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE (2003) Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med.* 349:1157-67

Kim SH, Ryan TA (2010) CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67:797-809

Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 65:189-97

Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M (1993) Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell.* 75:113-22

Kobayashi S, Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Arioka M, Imahori K, Uchida T (1993) A *cdc2*-related kinase PSSALRE/*cdk5* is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett.* 335:171-5

Korinthenberg R, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S (2005) Spinale Muskelatrophie. *DGM Management of neuromuscular diseases*, Letter Nr. 31

Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H (1985) Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* 4:1389-93

Krieger F, Elflein N, Ruiz R, Guerra J, Serrano AL, Asan E, Tabares L, Jablonka S (2013) Fast motor axon loss in SMARD1 does not correspond to morphological and functional alterations of the NMJ. *Neurobiol Dis.* 54:169-82

Lacrima K, Valentini A, Lambertini C, Taborelli M, Rinaldi A, Zucca E, Catapano C, Cavalli F, Gianella-Borradori A, MacCallum DE, Bertoni F (2005) In vitro activity of cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Seliciclib, R-roscovitine) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol.* 16:1169-76

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavriliu TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMN $\Delta$ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet.* 14:845-57

Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E (2010) Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer.* 46:3243-50

Lee HK, Elmslie KS (1999) Gating of single N-type calcium channels recorded from bullfrog sympathetic neurons. *J Gen Physiol.* 113:111-24

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 80:155-65

Lefebvre S, Bulet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 16:265-9

Li Y, Calfa G, Inoue T, Amaral MD, Pozzo-Miller L (2010) Activity-dependent release of endogenous BDNF from mossy fibers evokes a TRPC3 current and Ca<sup>2+</sup> elevations in CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 103:2846-56

Liang M, Tarr TB, Bravo-Altamirano K, Valdomir G, Rensch G, Swanson L, DeStefino NR, Mazzarisi CM, Olszewski RA, Wilson GM, Meriney SD, Wipf P (2012) Synthesis and biological evaluation of a selective N- and p/q-type calcium channel agonist. *ACS Med Chem Lett.* 3:985-90

Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 15:3555-65

Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell.* 90:1013-21

Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet.* 9:259-65

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6307-11

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet.* 19:63-6

Luckenbill-Edds L (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev.* 23:1-27

Lyon AN, Pineda RH, Hao le T, Kudryashova E, Kudryashov DS, Beattie CE (2014) Calcium binding is essential for plastin 3 function in Smn-deficient motoneurons. *Hum Mol Genet.* 23:1990-2004

Maher PA (1988) Nerve growth factor induces protein-tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:6788-91

Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 5:501-9

Mandelkow E (1999) Alzheimer's disease. The tangled tale of tau. *Nature.* 402:588-9

Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K, Taniguchi H (1996) Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem.* 271:21108-13

McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1996) Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron.* 17:1057-64

McClue SJ, Stuart I (2008) Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine) in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos.* 36:561-70

McGivern JV, Patitucci TN, Nord JA, Barabas MA, Stucky CL, Ebert AD (2013) Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia.* 61:1418-1428



Meakin SO, Shooter EM (1991) Molecular investigations on the high-affinity nerve growth factor receptor. *Neuron*. 6:153-63

Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem*. 243:527-36

Meijer L, Raymond E (2003) Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res*. 36:417-25

Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*. 344:767-8

Menn B, Bach S, Blevins TL, Campbell M, Meijer L, Timsit S (2010) Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models. *PLoS One*. 5:e12117

Miller N, Feng Z, Edens BM, Yang B, Shi H, Sze CC, Hong BT, Su SC, Cantu JA, Topczewski J, Crawford TO, Ko CP, Sumner CJ, Ma L, Ma YC (2015) Non-aggregating tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 contributes to motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy. *J Neurosci*. 35:6038-50

Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*. 8:1177-83

Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic

lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 9:333-9

Nakata H, Nakamura S (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. *FEBS Lett.* 581:2047-54

Nikolic M, Chou MM, Lu W, Mayer BJ, Tsai LH (1998) The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature.* 395:194-8

Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH (1996) The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10:816-25

Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature.* 432:580-7

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11173-8

Oppenheim RW, Yin QW, Prevet D, Yan Q (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature.* 360:755-7

Paglini G, Pigo G, Kunda P, Morfini G, Maccioni R, Quiroga S, Ferreira A, Cáceres A (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci.* 18:9858-69

Patil PG, Brody DL, Yue DT (1998) Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron.* 20:1027-38

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 402:615-22

Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002) The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol*. 14:305-12

Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11167-72

Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell*. 95:615-24

Pigino G, Paglini G, Ulloa L, Avila J, Cáceres A (1997) Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci*. 110:257-70

Pinter MJ, Waldeck RF, Wallace N, Cork LC (1995) Motor unit behavior in canine motor neuron disease. *J Neurosci*. 15:3447-57

Pitt M, Houlden H, Jacobs J, Mok Q, Harding B, Reilly M, Surtees R (2003) Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain* 126: 2682-92

Porensky PN, Mitropant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK, Wilton SD, Burghes AH (2012) A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet*. 21:1625-38

Porter BE, Weis J, Sanes JR (1995) A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron*. 14:549-59

Rathod R, Havlicek S, Frank N, Blum R, Sendtner M (2012) Laminin induced local axonal translation of  $\beta$ -actin mRNA is impaired in SMN-deficient motoneurons. *Histochem Cell Biol.* 138:737-48

Raynaud FI, Whittaker SR, Fischer PM, McClue S, Walton MI, Barrie SE, Garrett MD, Rogers P, Clarke SJ, Kelland LR, Valenti M, Brunton L, Eccles S, Lane DP, Workman P (2005) In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, boheminine and CYC202. *Clin Cancer Res.* 11:4875-87

Reuter H (1996) Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 6:331-7

Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, Swoboda KJ, Löhr H, Bradler C, Grysko V, Dimitriadi M, Hosseinibarkooie S, Torres-Benito L, Peters M, Upadhyay A, Biglari N, Kröber S, Hölker I, Garbes L, Gilissen C, Hoischen A, Nürnberg G, Nürnberg P, Walter M, Rigo F, Bennett CF, Kye MJ, Hart AC, Hammerschmidt M, Kloppenburg P, Wirth B (2017) Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am J Hum Genet.* 100:297-315

Ruiz R, Casañas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010) Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 30:849-57

Ruiz R, Tabares L (2014) Neurotransmitter release in motor nerve terminals of a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *J Anat.* 224:74-84

Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE (1995) Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 4:631-4

Rodríguez-Santiago M, Mendoza-Torres M, Jiménez-Bremont JF, López-Revilla R (2007) Knockout of the *trcp3* gene causes a recessive neuromotor disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 360:874-9

Rosato Siri MD, Uchitel OD (1999) Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *J Physiol.* 514:533-40

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) *Smn*, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol.* 163:801-12

Rousselet E, Létondor A, Menn B, Courbebaisse Y, Quillé ML, Timsit S (2018) Sustained (S)-roscovitine delivery promotes neuroprotection associated with functional recovery and decrease in brain edema in a randomized blind focal cerebral ischemia study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 38:1070-1084

Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res.* 326:376-91

Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9920-5

Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD, Morgan DO, Meijer L, Vesely J, Kim SH (1995) Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins.* 22:378-91

Schutte B, Nieland L, van Engeland M, Henfling ME, Meijer L, Ramaekers FC (1997) The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res.* 236:4-15

Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature.* 360:757-9

Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature.* 345:440-1

Shapiro GI, Hilton J, Cleary JM, Tolaney SM, Ghandi L, Kwak EL, Clark JW, Wolanski A, Bell T, Schulz J, Frame S, Saladino C, Hogben M, Rodig SJ, Chiao JH, Blake D (2013) Responses to sequential sapacitabine and seliciclib in patients with BRCA-deficient solid tumors. *Cancer Res* 73; LB-202

Shelton SB, Johnson GV (2004) Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J Neurochem.* 88:1313-26

Sheng ZH, Rettig J, Cook T, Catterall WA (1996) Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature.* 379:451-4.

Shuang R, Zhang L, Fletcher A, Groblewski GE, Pevsner J, Stuenkel EL (1998) Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. *J Biol Chem.* 273:4957-66

Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol.* 26:1333-46

Spafford JD, Zamponi GW (2003) Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr Opin Neurobiol.* 13:308-14

Spitzer NC (2002) Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *J Physiol Paris.* 96:73-80

Spitzer (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature.* 444:707-12

Subramanian N, Wetzell A, Dombert B, Yadav P, Havlicek S, Jablonka S, Nassar MA, Blum R, Sendtner M (2012) Role of Na(v)1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Hum Mol Genet.* 21:3655-67

Surrey V, Zöllner C, Lork AA, Moradi M, Balk S, Dombert B, Saal-Bauernschubert L, Briese M, Appenzeller S, Fischer U, Jablonka S (2018) Impaired Local Translation of  $\beta$ -actin mRNA in Ighmbp2-Deficient Motoneurons: Implications for Spinal Muscular Atrophy with respiratory Distress (SMARD1). *Neuroscience.* 386:24-40.

Sutter A, Riopelle RJ, Harris-Warrick RM, Shooter EM (1979) Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol Chem.* 254:5972-82

Takahashi S, Kulkarni AB (2004) Mutant superoxide dismutase 1 causes motor neuron degeneration independent of cyclin-dependent kinase 5 activation by p35 or p25. *J Neurochem.* 88:1295-304

Tarr TB, Lacomis D, Reddel SW, Liang M, Valdomir G, Frasso M, Wipf P, Meriney SD (2014) Complete reversal of Lambert-Eaton myasthenic syndrome synaptic impairment by the combined use of a K<sup>+</sup> channel blocker and a Ca<sup>2+</sup> channel agonist. *J Physiol.* 592:3687-96

Tarr TB, Valdomir G, Liang M, Wipf P, Meriney SD (2012) New calcium channel agonists as potential therapeutics in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and other neuromuscular diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1275:85-91

*Tejero R, Balk S, Surrey V, Hennlein L, Dombert B, Drexl H, Zapantis N, Clausen JD, Torres-Benito L, Saal-Bauernschubert L, Briese M, Blum R, Appenzeller S, Tabares L, Jablonka S. Calcium channel modulation improves motoneuron function in mouse models for Spinal Muscular Atrophy. (in press)*

Tejero R, Lopez-Manzaneda M, Arumugam S, Tabares L (2016) Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet.* 25:4703-4716

Tolaney SM, Hilton JF, Cleary JM, Gandhi L, Kwak LE, Clark JW, Wolanski A, Bell TD, Rodig SJ, Chiao JH, Blake D, Shapiro G (2016) Phase I study of sapacitabine and seliciclib in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 34

Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M, Moriwaki A, Li ST, Takei K, Matsui H (2002) Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity. *J Neurosci.* 22:2590-7

Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R, Tabares L (2011) SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One.* 6:e26164

Translation of  $\beta$ -actin mRNA in Ighmbp2-Deficient Motoneurons: Implications for Spinal Muscular Atrophy with respiratory Distress (SMARD1). *Neuroscience.* 386:24-40



Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 382:80-3

Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernández-Chico C (1996) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet*. 5:257-63

Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem*. 224:771-86

Viollet L, Bertrand S, Bueno Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guénet JL, Munnich A, Melki J (1997) cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). *Genomics*. 40:185-8

Vita M, Abdel-Rehim M, Olofsson S, Hassan Z, Meurling L, Sidén A, Sidén M, Pettersson T, Hassan M (2005) Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat. *Eur J Pharm Sci*. 25:91-103

Vita M, Meurling L, Pettersson T, Cruz-Sidén M, Sidén A, Hassan M (2004) Analysis of roscovitine using novel high performance liquid chromatography and UV-detection method: pharmacokinetics of roscovitine in rat. *J Pharm Biomed Anal*. 34:425-31

Vitali T, Sossi V, Tiziano F, Zappata S, Giuli A, Paravatou-Petsotas M, Neri G, Brahe C (1999) Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH:

further evidence for a role for SMN2 in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum Mol Genet.* 8:2525-32

Weskamp G, Reichardt LF (1991) Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron.* 6:649-63

Westenbroek RE, Hoskins L, Catterall WA (1998) Localization of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci.* 18:6319-30

Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 15:6403-18

Wiese S, Herrmann T, Drepper C, Jablonka S, Funk N, Klausmeyer A, Rogers ML, Rush R, Sendtner M (2010) Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *Nat Protoc.* 5:31-8

Wiese S, Metzger F, Holtmann B, Sendtner M (1999) The role of p75<sup>NTR</sup> in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci.* 11:1668-76

Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Horky M (2005) Roscovitine-induced up-regulation of p53AIP1 protein precedes the onset of apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 4:113-24

Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggerbauer B, Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev.* 19:2320-30

Yan Q, Elliott J, Snider WD (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature*. 360:753-5

Yan Z, Chi P, Bibb JA, Ryan TA, Greengard P (2002) Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J Physiol*. 540:761-70

Yao J, Sasaki Y, Wen Z, Bassell GJ, Zheng JQ (2006) An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci*. 9:1265-73

Yarden Y, Ullrich A (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 57:443-78

Young PJ, Le TT, thi Man N, Burghes AH, Morris GE (2000) The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res*. 256:365-74

Zhang M, Li J, Chakrabarty P, Bu B, Vincent I (2004) Cyclin-dependent kinase inhibitors attenuate protein hyperphosphorylation, cytoskeletal lesion formation, and motor defects in Niemann-Pick Type C mice. *Am J Pathol*. 165:843-53

Zhong N, Zucker RS (2004) Roles of Ca<sup>2+</sup>, hyperpolarization and cyclic nucleotide-activated channel activation, and actin in temporal synaptic tagging. *J Neurosci*. 24:4205-12

### 8.3 Danksagung

Liebe *Sibylle*, ich danke dir für dein Engagement, deine Ausbildung, deine Betreuung und Begleitung und für die Bereitstellung des Projekts und die Planung der Experimente. Vielen Dank für die stets gute Zusammenarbeit, für deine Unterstützung, die ausführlichen Gespräche und die guten Ideen.

Lieber Herr *Prof. Sendtner*, ich danke Ihnen, dass ich meine Doktorarbeit an Ihrem Institut anfertigen durfte. Vielen Dank für Ihre Betreuung und Begleitung, für Ihre Hilfe bei der Projektplanung und bei Fertigstellung der Arbeit.

Liebe Frau *Prof. Asan*, ich danke Ihnen für Ihr Interesse an meiner Doktorarbeit, für die intensiven Gespräche und für Ihre Angebote und Vorschläge, mich bei meinem Projekt zu unterstützen.

Liebe *Verena*, Ich danke dir für deine Kompetenz und deine Zusammenarbeit. Wir haben viel gemeinsam erleben dürfen und eine großartige Zeit zusammen verbracht.

Lieber *Benni*, auch dir ein großes Dankeschön für alles, was du mir beigebracht hast und für das Projekt, das wir zusammen fertiggestellt haben. Ich werde unsere gemeinsame Zeit im Labor immer gut in Erinnerung behalten.

Liebe *Nicole*, vielen vielen Dank für deine Hilfe von den ersten Handgriffen bis zur Fertigstellung und für dein offnes Ohr in allen Situationen und Lebenslagen.

Lieber *Apoorva* und liebe *Alicia*, ich danke euch für euer Engagement und eure Unterstützung und hoffe, dass wir noch lange gute Freunde bleiben.

Ein großes Dankeschön geht an alle ehemaligen Kollegen und Kolleginnen, insbesondere an *Roscio, Rajeeve, Preeti, Regine, Lena, Michael, Corinna, Manju, Cora, Jan, Patrick, Nikolaos* und *Robert* sowie an alle Mitarbeiter des Tierstalls und der Verwaltung für die reibungslose Zusammenarbeit.

An meine Eltern *Barbara* und *Friedrich*, meine Geschwister *Florian* und *Christina* und an meine Freunde, insbesondere *Stefanie* und *Colin*: Ich danke euch für alles, was ihr für mich getan habt und für das, was ich heute bin. Ihr macht mein Leben wertvoll. Vielen Dank!



## 8.4 Publikationsliste

### Publikationsliste:

Surrey V, Zöller C, Lork AA, Moradi M, **Balk S**, Dombert B, Saal-Bauernschubert L, Briese M, Appenzeller S, Fischer U, Jablonka S. Impaired Local Translation of  $\beta$ -actin mRNA in Ighmbp2-Deficient Motoneurons: Implications for Spinal Muscular Atrophy with respiratory Distress (SMARD1). **Neuroscience**. 2018 Jun

Dombert B, **Balk S**, Lüningschrör P, Moradi M, Sivadasan R, Saal-Bauernschubert L, Jablonka S. BDNF/trkB Induction of Calcium Transients through Cav2.2 Calcium Channels in Motoneurons Corresponds to F-actin Assembly and Growth Cone Formation on  $\beta$ 2-Chain Laminin (221). **Front Mol Neurosci**. 2017 Oct

## 8.5 Eidesstattliche Erklärung

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation ‘Der Einfluss des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine auf die zelluläre Differenzierung von Motoneuronen eines Mausmodells für Spinale Muskelatrophie Typ 1 (SMA)’ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled ‘The effect of the calcium channel agonist R-Roscovitine on cellular differentiation of motoneurons from a mouse model for spinal muscular atrophy type 1 (SMA)’ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

---

Place, Date

---

Signature