

**Aus dem Institut für klinische Neurobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner

***Der Einfluss des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine auf
die Entwicklung und Differenzierung kultivierter primärer
Motoneurone eines murinen Modellorganismus für spinale
Muskelatrophie Typ I***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan-Dierk Clausen

aus Hannover

Würzburg, Juli 2020



Referentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sibylle Jablonka

Korreferentin: Professorin Dr. med. Nurcan Üçeyler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2020

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CNTF	ciliary derived neurotrophic factor
CTX	Conotoxin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIV	days in vitro
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GABA	gamma-Aminobuttersäure
gems	gemini of coiled bodies
Glutamax	L-Alanyl-L-Glutamin
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2- Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- ethansulfonsäure
hnRNP-R	heterogenous nuclear ribonucleoprotein R
HPLC	High-performance liquid chromatography
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
LPS	Lipopolysaccharid
LRE- site	Leucin-Arginin-Glutamat-Motiv
mut	Mutante
mRNA	messenger ribonucleic acid
NB	Neurobasal- Medium
NF-kb	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B- cells
NSE	Neuronspezifische Enolase

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PORN	Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid
PSD	post synaptic density
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	RNA recognition motif
R-Roscovitine	(R)-2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin
S-Roscovitine	(S)-2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, Standardabweichung
SIP1	SMN Interacting Protein 1
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	survival motor neuron Gen
SMN 2	humane Duplikatur des SMN Gens
SMN Δ 7	trunkiertes SMN- Protein ohne Exon 7
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween
Tg	transgen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TR	trunkiertes, unvollständiges Protein
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSA	Trichostatin A
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U snRNP	Uridine rich small nuclear ribonucleoprotein
VGCC	spannungsabhängiger Kalziumkanal
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Motoneurone und Motoneurerkrankungen	1
1.1.1 Von der Idee zur Bewegung	1
1.1.2 Motoneurerkrankungen im Kontext der Bewegung	2
1.1.3 Aufbau und Entwicklung eines Motoneurons	3
1.2 Spinale Muskelatrophie - SMA	5
1.2.1 Klinisches Erscheinungsbilder der SMA	5
1.2.2 Genetik der SMA – Das SMN Gen	8
1.2.3 Genetik der SMA – Ursache der SMA	10
1.2.4 Genetik der SMA – Das SMN-Protein	11
1.2.5 Relevanz des SMN Proteins in neuronalen Strukturen	13
1.2.6 Interaktion des SMN Proteins – Krankheitstheorie der SMA	15
1.2.7 Tiermodelle	17
1.3 Aktuelle und zukünftige Behandlungsansätze der SMA	18
1.4 Die Rolle der Kalziumkanäle im Rahmen der Differenzierung Motoneuronen im Kontext der SMA	22
1.4.1 Kalziumkanäle und Differenzierung von Motoneuronen	22
1.4.2 Relevanz der Kalziumkanäle in Bezug auf die SMA	25
1.4.3 R-Roscovitine	27
2. Zielsetzung der Arbeit	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.1.1 Mauslinien	30
3.1.2 technische Geräte	30
3.1.3 eingesetzte Software	31
3.1.4 allgemeine Verbrauchsmaterialien	31
3.1.5 eingesetzte Chemikalien	31
3.1.6 Medien und Pufferlösungen	33
3.1.7 Antikörper, Enzyme und Primer	35
3.2 Zellkultur und Tiermodelle	36
3.2.1 Tierhaltung und Mauslinie	36
3.2.2 Kultivierung primärer Motoneurone	36
3.2.3 Genotypisierung	38
3.3 Immunzytochemie und Western Blot	40
3.3.1 Immunzytochemie und Mikroskopie	40
3.3.2 Western blot Analysen	41
3.4 Statistik	43
4. Ergebnisse	44
4.1 R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des axonalen Längenwachstums in der Motoneuronkultur auf Laminin-221	44
4.2 R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin	47
4.3 R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Intensität der $Ca_v2.2$ -Kalziumkanäle am Wachstumskegel	51

4.4 S-Roscovotine führt nicht zu einer Normalisierung der Axonlängen auf Laminin-221	53
4.5 Die Proteinmenge an CDK 5 ist im Falle der spinalen Muskelatrophie nicht erhöht und der Einsatz von R-Roscovotine beeinflusst die CDK 5-Proteinmenge nicht	56
4.6 Die pränatale Behandlung des Muttertieres mit 0,5 µM R-Roscovotine führt zu einer Normalisierung des Längenwachstums	58
5. Diskussion	60
5.1 Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovotine zu einer restitutio des axonalen Wachstums in der Zellkultur?	62
5.2 Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovotine zu einer restitutio der Größe und Organisation des Wachstumskegels?	65
5.3 Lässt sich durch die pränatale Applikation von R-Roscovotine in ein trächtiges Muttertier eine nutzbringende Wirkung bei Smn-defizienten Nachkommen erzielen?	66
5.4 Ist der positive Effekt von R-Roscovotine isoliert durch einen Agonismus am spannungsabhängigen Kalziumkanal bedingt oder spielt die Modulation der Cyclin dependent kinase 5 (CDK5) ebenfalls eine Rolle?	67
5.5 Roscovitine als Therapeutikum – aktueller Einsatz und möglicher Einsatz in der spinalen Muskelatrophie	74
5.6 Limitationen	78
6. Zusammenfassung	79
7. Anhang	80
7.1 Abbildungsverzeichnis	80
7.2 Tabellenverzeichnis	81
7.3 Literaturverzeichnis	81
7.4 Abbildungslizenzen	
7.5 Danksagung	
7.6 Lebenslauf	
7.7 Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Motoneurone und Motoneuronerkrankungen

1.1.1 Von der Idee zur Bewegung

Motoneurone sind einer der zentralen Pfeiler im Rahmen von Bewegungsvorgängen. Beleuchtet man den Vorgang einer Bewegung im Detail, beginnt diese im prämotorischen Cortex des Gehirns. Hier werden „Bewegungsentwürfe“ generiert und mit anderen Arealen, wie z.B. dem Kleinhirn und den Basalganglien abgestimmt. Der generierte Bewegungsablauf läuft weiter zum primär-motorischen Cortex des Großhirns, dem Gyrus praecentralis. Hier liegen die Zellkörper der primären Motoneurone. Diese erinnern in der Form, wie auch in anderen Arealen des Großhirns, an eine Pyramide. In der gängigen Brodman-Einteilung wird sie als Area 4 oder Area gigantopyramidalis bezeichnet und die einzelnen Zellen nach dem Anatom Wladimir Betz als „Betzsche Zellen“. Innerhalb des Gyrus praecentralis sind die einzelnen Regionen des Körpers umgekehrt, als sog. Homunculus repräsentiert.

Von hier aus wird der Bewegungsablauf entlang der Axone der primären Motoneurone an Hirnnervenkerne oder direkt an das Rückenmark weitergeleitet. Die Gesamtheit der Axone, welche die primär motorische Rinde verlassen, bezeichnet man als Pyramidenbahn oder Tractus corticospinalis. Im Tractus corticospinalis laufen zusätzlich noch Anteile aus den sekundär und supplementär motorischen Anteilen, sowie aus sensomotorischen Arealen. Auf Höhe der Medulla oblongata kreuzen etwa 70-90% der Axone auf die kontralaterale Seite und bilden hier den Tractus corticospinalis lateralis. Die verbliebenen Axone laufen ipsilateral als Tractus corticospinalis anterior weiter. Die Zahl der kreuzenden Axone unterscheidet sich innerhalb der Klasse der Säugetiere zum Teil erheblich, was erklärt, dass Läsionen in diesem System trotz gleicher Lokalisation jeweils eine andere Symptomatik in den unterschiedlichen Arten aufweisen können.

Auf Rückenmarksebene erfolgt dann die Verschaltung auf die motorischen Vorderhornzellen des sogenannten zweiten Motoneurons. Die Axone der entsprechenden Somata der Motoneurone verlassen dann über die segmentalen Spinalnerven das Rückenmark in Richtung der Zielmuskulatur. Über die motorische Endplatte, eine hochspezialisierte Synapse, erfolgt dann letztendlich die Innervation

des Zielmuskels, woraus letztlich die eigentliche Bewegung resultiert. Innerhalb des zweiten Motoneurons unterscheidet man aufgrund ihrer Leitfähigkeit $A\alpha$ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 75-120m/s von $A\gamma$ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 15-30m/s. Die $A\alpha$ -Fasern innervieren den Skelettmuskel im Wesentlichen extrafusall und sind somit hauptsächlich für die resultierende Muskelkontraktion verantwortlich. $A\gamma$ -Fasern hingegen die intrafusalen Anteile. Dies umfasst unter anderem Muskelspindeln. Die Innervation über die $A\gamma$ -Fasern hat zur Folge, dass sich Muskelspindel und Muskelfasern sich parallel verkürzen umso eine gleichbleibende Empfindlichkeit der muskulären Sinnesorgane zu gewährleisten. (Kandel, Schwartz; Principles of Neural Science, 5. Auflage)

1.1.2 Motoneuronerkrankungen im Kontext der Bewegung

Die Gruppe der Motoneuronerkrankungen ist eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen. Vereinfacht dargestellt wird das motorische System in zwei Ebenen aufgeteilt: das erste und zweite Motoneuron. Das erste Motoneuron wird gebildet aus den Pyramidalzellen des motorischen Cortex (v.a. Gyrus praecentralis) und der Pyramidenbahn. Das zweite Motoneuron wird auf Hirnebene durch die motorischen Hirnnervenkerne und auf Rückenmarksebene durch die motorischen Vorderhornzellen gebildet.

Je nach betroffenem System, kann man daher Motoneuronerkrankungen des ersten Motoneurons von denen des zweiten Motoneurons abgrenzen. Häufig existieren aber auch kombinierte Formen. Typische Symptome von Erkrankungen des ersten Motoneurons sind Hyperreflexie und eine spastische Tonuserhöhung der Muskulatur durch den Wegfall inhibitorischer Verschaltungen, wie zum Beispiel im Falle der primären Lateralsklerose.

Charakteristisch für Erkrankungen des zweiten Motoneurons sind schlaffe Paresen und ein Verlust der Eigenreflexe.

Unter den Motoneuronerkrankungen erlangte vor allem die amyotrophe Lateralsklerose durch die Erkrankung des Physikers Stephen Hawking oder des Baseballspielers Lou Gehrig Aufmerksamkeit. Eine der bekanntesten Erkrankungen des zweiten Motoneurons ist die spinale Muskelatrophie, um die es in der folgenden Arbeit gehen wird. Sie ist insofern besonders relevant, da sie die zweithäufigste, potentiell letale, monogenetische Erkrankung nach der zystischen Fibrose ist.

1.1.3 Aufbau und Entwicklung eines Motoneurons

Ursprung der Entwicklung der Motoneurone ist das Neuralrohr.

Hier entwickeln sie sich aus der Basalplatte. Die Differenzierung der Motoneurone wird auf genetischer Ebene unter anderem über die Expression des SHH- und Hox-Gens moduliert. Hierüber wird bereits früh festgelegt, in welcher Lokalisation des Nervensystems das entsprechende Motoneuron im Verlauf auftaucht. Des Weiteren spielen Glykoproteine der extrazellulären Matrix, neurotrophe Faktoren und Kalziumkanäle eine wesentliche Rolle im Rahmen der Differenzierung eines Motoneurons. Wesentliche funktionelle Anteile eines Motoneurons sind der Zellkörper mit den Dendriten, in dem eine Signalverarbeitung stattfindet (Kandel, Schwartz; Principles of Neural Science, 5. Auflage).

Direkt distal hiervon befindet sich der Axonhügel, der in das Axon übergeht. Hier wird ein Aktionspotenzial generiert und über das Axon nach distal fortgeleitet. Der Wachstumskegel bildet das distale Ende des Axons. Hier werden neue synaptische Verbindungen geknüpft und spezialisierte Strukturen wie die neuromuskuläre Endplatte ausgebildet. Die adäquate Entwicklung des Wachstumskegels ist ein wichtiger Schritt in der Differenzierung eines Motoneurons. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Differenzierung der Motoneurone im Laufe der Entwicklung. Diese werden im Folgenden näher beleuchtet.

Laminine - Glykoproteine der extrazellulären Matrix

Von besonderer Relevanz für die Entwicklung der Neurone sind Glykoproteine. Innerhalb dieser Gruppe spielen vor allem Laminine eine Rolle. Diese großen, quervernetzten Glykoproteine sind aus drei Polypeptidketten zusammengesetzt. Die einzelnen Polypeptid-Untereinheiten weisen nochmals unterschiedliche Subtypen auf, sodass sich je nach Zusammensetzung der Untereinheiten unterschiedliche Laminin-Typen ergeben.

Bis heute wurden insgesamt fünf α -, sowie je drei β - und drei γ -Untereinheiten beschrieben (Li, Edgar et al. 2003, Nishimune, Sanes et al. 2004, Chen, Billings et al. 2011). Diese sind je nach Kombination der Untereinheiten an der Differenzierung unterschiedlicher Zellen beteiligt (Burgeson, Chiquet et al. 1994, Luckenbill-Edds 1997).

Für die in vitro Differenzierung von Motoneuronen spielen im wesentlichen Laminin-111 (Laminin-1), bestehend aus den Untereinheiten α 1, β 1 und γ 1, sowie das Laminin-

221 (Laminin-4), bestehend aus den Untereinheiten $\alpha 2$, $\beta 2$ und $\gamma 1$ eine Rolle. Die Interaktion von Laminin-221 als Bestandteil der Extrazellulärmatrix mit dem auswachsenden Axon, führt zu einem Stopp des axonalen Wachstums (Porter and Sanes 1995, Porter, Weis et al. 1995, Nishimune, Sanes et al. 2004).

Es wird angenommen, dass der Stopp des axonalen Wachstums die Differenzierung des distalen Axons einleitet. Vor alle Laminine mit $\beta 2$ -Kette kommen gehäuft im Bereich der Basallamina von muskulären Endplatten vor. Hier sind sie auf Seiten des Muskels lokalisiert und leiten über die Interaktion mit dem Axon die Ausbildung der neuromuskulären Endplatte ein (Hall 1995). In Untersuchungen wurde gezeigt, dass Tiere denen diese Laminine fehlen, nicht in der Lage waren voll funktionale neuromuskuläre Verbindungen zu bilden. Es zeigten sich hier deutlich weniger „aktive Zonen“ im Bereich der synaptischen Verbindungen, als Ausdruck einer gestörten Differenzierung des terminalen Axons (Noakes, Gautam et al. 1995, Rogers and Nishimune 2017). Charakteristisch für diese nicht funktionalen neuromuskulären Verbindungen sind niedrigere Frequenzen der „Miniatur-Endplatten-Potenziale“, welche essentiell für die neuronale Differenzierung sind. Eine wesentliche Grundlage für die Entstehung dieser Endplattenpotenziale ist die LRE-Tripeptidsequenz an der $\beta 2$ -Kette der Laminine. Diese interagiert direkt mit der porenbildenden Einheit der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom Typ $Ca_v 1.1$ und $Ca_v 2.1$. Hieraus resultiert eine erhöhte „Offenwahrscheinlichkeit“ der Kanäle, was zu einem lokal erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle führt. Dieser vermehrte Kalziumeinstrom hat wiederum zur Folge, dass sich vermehrt Kalziumkanäle im Bereich der Präsynapse zu sogenannten Clustern zusammenlagern (Nishimune, Sanes et al. 2004). Die Cluster sind essentiell für die synaptische Transmission an der neuromuskulären Endplatte (Jablonka, Rossoll et al. 2000).

Neben der herausragenden Rolle der $\beta 2$ -Kette spielen auch die Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ eine Rolle bei der Organisation der neuromuskulären Endplatte. (Holmberg and Durbeej 2013, Rogers and Nishimune 2017, Holmberg and Durbeej 2013).

Weitere Differenzierungsfaktoren der Motoneurone:

Neben den Lamininen spielen zahlreiche neurotrophe Faktoren in der Entwicklung der Motoneurone eine Rolle. Ihnen gemeinsam ist die Eigenschaft, die Entwicklung und Differenzierung der Neurone zu fördern. Hervorzuheben ist besonders die Familie der Neurotrophine mit dem *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor*

(BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3) und *neurotrophin-4/5* (NT-4/5)). Darüber hinaus spielen der ciliary neurotrophic factor (CNTF) und der glial cell-Line derived neurotrophic factor (GDNF) eine Rolle.

Die Kalziumkanäle als einer der wichtigsten Faktoren für die Differenzierung von Motoneuronen werden in Kapitel 1.3.1 separat beleuchtet.

1.2 Spinale Muskelatrophie - SMA

Erstmals beschrieben 1890 durch Guido Werdnig, hat sich das Verständnis der SMA seit damals deutlich weiterentwickelt. Werdnig beschrieb einen Fall von „Muskeldystrophie mit positiven Rückenmarksbefunden“. Nahezu zeitgleich veröffentlichte Hoffmann 1892 unter den Titeln „Ueber familiäre progressive spinale Muskelatrophie“ und „Ueber chronische progressive Muskelatrophie“ weitere Fallanalysen (Iannaccone 1998).

Im Verlauf wurde in histologischen Untersuchungen des Rückenmarks und der Muskulatur von SMA-Patienten eine deutliche Reduktion der Anzahl an Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks und eine Atrophie von Skelettmuskelfasern beschrieben (Kariya, Park et al. 2008). Bereits in den 1970er Jahren wurde durch die Analyse familiärer Fälle von SMA ein heterozygoter Erbgang postuliert. (Pearn 1973, Pearn, Hudgson et al. 1978, Pearn 1980). 2012 wurde in einer groß angelegten Studie mit über 72.400 humanen Proben eine Heterozygoten Frequenz von 1:54 beschrieben. Die Inzidenz wurde mit 1:11.000 beziffert (Sugarman, Nagan et al. 2012). Somit ist die spinale Muskelatrophie, nach der zystischen Fibrose, welche eine Inzidenz von ca. 1:3300 aufweist, für unsere Breitengrade die zweithäufigste Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang und potentiell letalem Verlauf bei Kindern (O'Sullivan and Freedman 2009).

1.2.1 Klinisches Erscheinungsbild der spinalen Muskelatrophie

Das entscheidende klinische Merkmal der SMA ist eine progrediente, proximal betonte und zumeist symmetrische Muskelschwäche und -atrophie, welche in einer Plegie gipfelt. Frühe Symptome der Erkrankung sind Faszikulationen der betroffenen Muskelgruppen. Im Verlauf können aufgrund der muskulären Dysbalance sekundäre Probleme wie Skelettanomalien auftreten. Der Faktor welcher die Letalität bestimmt, ist die Beeinträchtigung der Atmung. Charakteristisch für die klassische spinale

Muskelatrophie ist darüber hinaus das Fehlen von Sensibilitätsstörungen (Rudnik-Schoneborn, Goebel et al. 2003, Anagnostou, Miller et al. 2005). Affektionen des vegetativen Nervensystems sind extrem selten und werden in der Regel nicht beschrieben.

Bereits früh wurde versucht eine Klassifikation der Erkrankung zu etablieren, welche sich an der Symptomschwere (Byers and Banker 1961), sowie auch an dem Alter bei erstmaliger Symptommanifestation orientierte (Dubowitz 1964). Aktuell werden neben den Typen I-III noch ein Typ 0, sowie ein Typ IV unterschieden (Russman 2007).

SMA Typ 0:

Es handelt sich hierbei um die schwerste Verlaufsform. Die Kinder kommen bereits mit deutlicher Schwäche und Hypotonie der Muskulatur zur Welt. Die klinische Untersuchung bei Geburt zeigt klassischerweise ein Kind mit Areflexie und fazialen Lähmungen. Die Lebenserwartung der Kinder liegt in der Regel bei nicht mehr als sechs Monaten (Dubowitz 1999, MacLeod, Taylor et al. 1999, Kolb and Kissel 2015).

SMA Typ I:

In dieser, auch als Typ Werdnig-Hoffmann bezeichneten, Verlaufsform treten erste Symptome vor Beendigung des sechsten Lebensmonats auf. Charakteristisch ist eine generelle muskuläre Hypotonie mit reduzierten Reflexen. Klinisch imponierend ist die sogenannte „Froschbein“-Position im Liegen, kombiniert mit einer reduzierten Kontrolle über den Kopf. Darüber hinaus besteht bereits früh eine Hypotrophie der Interkostalmuskulatur. Die kognitive Entwicklung ist in der Regel normal. Die Lebenserwartung liegt unter zwei Jahren (Thomas and Dubowitz 1994, Zerres and Rudnik-Schoneborn 1995, Finkel, McDermott et al. 2014, Kolb and Kissel 2015).

SMA Typ II:

Erste Symptome treten in aller Regel vor dem 12. Lebensmonat auf. Zu Beginn findet sich eine vermehrte Schwäche der proximalen unteren Extremitäten. Durch die höhere Lebenserwartung stehen bei diesem Krankheitsverlauf auch orthopädische Probleme (z.B. Skoliosen) aufgrund der Muskelschwäche im Vordergrund.

Letalitätsbestimmend sind auch hier die pulmonalen Beeinträchtigungen, häufig mit septisch verlaufenden Pneumonien in der Endphase der Erkrankung. Insgesamt ist die Lebenserwartung sehr variabel und reicht von sieben Monaten bis zu sieben Jahren

(Zerres and Rudnik-Schoneborn 1995, Russman, Buncher et al. 1996, Iannaccone 1998, Kolb and Kissel 2015).

SMA Typ III:

Hierbei handelt es sich um eine milde Verlaufsform der spinalen Muskelatrophie. Der Typ III wird auch als Typ Kugelberg-Welander bezeichnet. Erste Symptome zeigen sich in nahezu allen Fällen nach dem 18. Lebensmonat. Charakteristisch ist eine beinbetonte Muskelschwäche. Je später dabei die ersten Symptome auftreten, desto benigner scheint auch der Krankheitsverlauf zu sein.

Dementsprechend wird häufig ein Typ IIIa mit Beginn vor dem 3. Lebensjahr, von dem Typ IIIb mit späterem Beginn unterschieden (Kugelberg and Welander 1956, Munsat and Davies 1992, Zerres, Rudnik-Schoneborn et al. 1997, Jablonka, Rossoll et al. 2000, Rudnik-Schoneborn, Hausmanowa-Petrusewicz et al. 2001, Piepers, van den Berg et al. 2008, Kolb and Kissel 2015).

SMA Typ IV:

Symptome treten hier in der Regel erst im Erwachsenenalter, selten bereits in der Phase der Adoleszenz, auf. Auch hier ist eine milde Schwäche der proximalen Anteile der Muskulatur der unteren Extremität führend. Die Lebenserwartung ist nur gering eingeschränkt (Piepers, van den Berg et al. 2008, Munsat and Davies 1992).

Die unterschiedlichen Subtypen der SMA sind in Tabelle 1 nochmals zusammenfassend dargestellt.

Typ	Symptombeginn (Lebensmonat)	motorische Meilensteine	Tod (Jahre)
0	intrauterin	keine	postnatal
I	< 6	kein freies Sitzen	< 2
II	< 12	kein freies Gehen	> 2
IIIa	< 36	freies Stehen und Gehen	Adoleszenz oder frühes Erwachsenenalter
IIIb	>36	freies Stehen und Gehen	Erwachsenenalter
IV	~ 30. LJ	freies Stehen und Gehen	Nahezu normal

Tabelle 1. Klassifikation und Subtypen der spinalen Muskelatrophie. Klassifikation nach Symptombeginn und Lebenserwartung, sowie den motorischen Meilensteinen, welche die betroffenen Kinder erreichen

Darüber hinaus werden zahlreiche Sonderformen abgegrenzt. Diese unterscheiden sich häufig in der Art des Erbganges oder in der Art der Symptome von den „klassischen Formen“ der spinalen Muskelatrophie. Als eine der wichtigsten Formen ist die Spinale Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (SMARD 1; spinal muscular atrophy with respiratory distress) zu nennen. Diese Erkrankung folgt ebenfalls einem autosomal-rezessiven Erbgang, betrifft aber ein anderes Protein (IGHMBP2, Chromosom 11q13). Charakteristisch sind hier eine symmetrische, distal betonte Muskelschwäche bis hin zur kompletten Muskelatrophie (Grohmann, Schuelke et al. 2001, Messina, Messina et al. 2012).

1.2.2 Genetik der spinalen Muskelatrophie – Das SMN-Gen

Die klassische Form der spinalen Muskelatrophie folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. Das Gen, dessen Defekt für die Erkrankung ursächlich ist, ist das „survival motor neuron Gen“ (SMN-Gen), welches auf dem langen Arm des Chromosom 5 (5q12-13) lokalisiert ist (Gilliam, Brzustowicz et al. 1990, Melki, Sheth et al. 1990, Wirth 2000). Neben dem SMN-Gen sind hier das NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), sowie die „basal transcription factor subunit“ p44 und H4F5 codiert (Lefebvre, Burglen et al. 1995, Burglen, Lefebvre et al. 1996, Lefebvre, Glorieux et al. 1996, Carter, Bonnemann et al. 1997, Lefebvre, Burlet et al. 1997, Jablonka, Schrank et al. 2000, Wirth 2000)

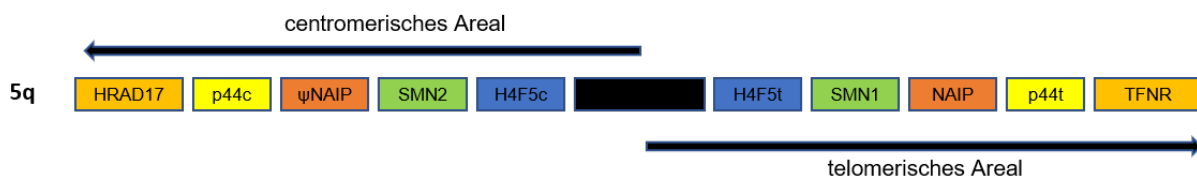


Abbildung 1: Schematische Darstellung der SMN1 und SMN2 Region des Chromosoms 5
 Darstellung der Lokalisation des SMN (survival motoneuron) -Gens auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 5. Im Menschen liegt das Gen zweifach vor. Die beiden Kopien SMN1 (telomerische Kopie) und SMN2 (centromerische Kopie) fast identisch und unterscheiden sich nur in etwa fünf Nukleotiden. Neben dem SMN-Gen liegen hier das NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) -Gen, ebenfalls in zweifacher Kopie, sowie die Gene für die „basal transcription factor subunit“ p44 und HF45. Im telomerischen Areal findet sich zusätzlich das TFNR (transcription factor-like nuclear regulator) -Gen sowie das „The human homolog of the Schizosaccharomyces pombe checkpoint gene rad17“ (Hrad17). All diese Gene spielen eine Rolle bei der Transkription, der Zellzykluskontrolle und apoptotischen Vorgängen. (eigene Abbildung adaptiert mit freundlicher Genehmigung an Wirth et. Al. 2000)

Das SMN-Gen, sowie die umliegenden Gene, liegen auf dem Chromosom zweifach in fast identischer Form vor und zwar einmal als centromerische und einmal als telomerische Kopie (Abb. 1).

Da sich die beiden Kopien nach aktueller Ansicht nur in etwa fünf Nukleotiden unterscheiden, wird angenommen, dass das SMN2-Gen als intra-chromosomale Duplikatur aus dem SMN1-Gen entstanden ist (Schmutz, Martin et al. 2004, Lorson, Rindt et al. 2010). Die cDNA weist sogar nur zwei Unterschiede auf. Zum einen in Exon 7 und zum anderen in Exon 8. Das Vorliegen einer zweiten Kopie des SMN-Gens scheint eine humane Besonderheit zu sein (Rochette, Gilbert et al. 2001). Der wesentliche Unterschied der Gene liegt im kodierenden Bereich von Exon 7 des SMN2-Gens (Codon 280). Der Austausch des sechsten Nukleotids von Cytosin zu Thymin führt zu einem alternativen Spleiß-Prozess, durch den es in etwa 85%-90% der SMN2-Transkripte zu einem Verlust, der von Exon 7 kodierten Regionen kommt. Dies resultiert in einem Genprodukt, welches deutlich kürzer und funktionell nicht intakt ist (SMN Δ Ex7). Ist das SMN1-Gen intakt vorhanden ist dies nicht relevant, da nahezu 100% in ein intaktes Protein translatiert werden. Das intakte Genprodukt bezeichnet man als volllängen (full-length) SMN (FL-SMN). Allein die Änderung des Carboxy-Terminus durch den Prozess des alternativen Splicings reicht für die Entstehung kürzerer und somit überwiegend funktionell nicht intakter Proteine aus. Diese instabilen Proteine bezeichnet man als trunkeerte SMN-Proteine (TR-SMN) (Abb. 2) (Monani et al. 2000, Le, Coover et al. 2000, Lorson and Androphy 2000). Ein wesentlicher Ansatz zum Verständnis des alternativen Splicing-Mechanismus beinhaltet die Theorie, dass das Exon 7 eine sogenannte „Exon-Splice-Enhancer-Binding-Site“ aufweist. Eine Änderung in dieser Sequenz hat zur Folge, dass das Herausspleißen dieses Areales gestört ist (DiDonato, Ingraham et al. 1997, Lorson, Hahnen et al. 1999, Cartegni and Krainer 2002).

Andere Studien konnten zeigen, dass weitere Regulationsareale das Herausspleißen des Exon 7 beeinflussen. Diese inhibitorischen Areale verhindern ein Herausspleißen des Exon 7 und führen zu einer Inklusion des Exon 7 in das entsprechende mRNA-Transkript führen. Eine Alteration in diesen Arealen führt zu einem Verlust des Exon 7 und führt, so die Theorie, konsekutiv zu einem fehlerhaften Protein. Die Arbeitsgruppe um Singh hat dieses Element im Verlauf als „inhibitory slicing silencer N 1“ (ISS N1) beschrieben. Lokalisiert ist dieses im Intron 7 (Singh, Androphy et al. 2004, Singh and Sharma 2004, Singh, Singh et al. 2006).

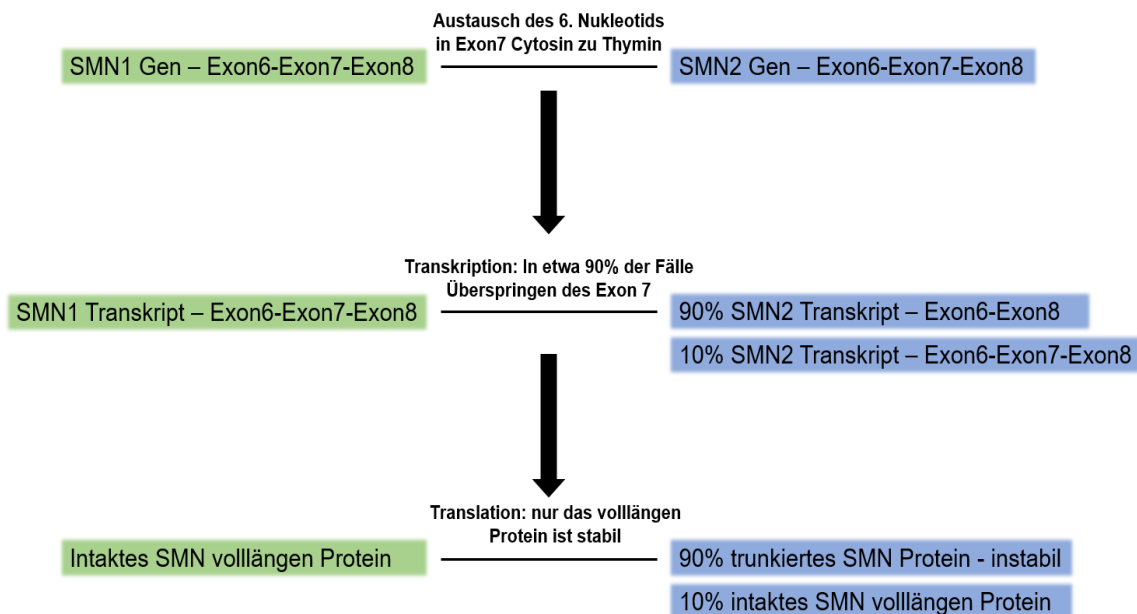


Abbildung 2: Unterschied des SMN 1 und 2 Gens in Transkription und Translation

Darstellung der Exone 6,7 und 8 des SMN 1 und SMN 2 Gens nach dem Spleißvorgang. Im Falle des SMN 2 Gens liegt ein Austausch des sechsten Nucleotids in Exon 7 von Cytosin zu Thymin vor. Dies führt dazu, dass es in etwa 90% der Fälle im Rahmen der Transkription des SMN2-Gens zu einem Verlust von Exon7 kommt. Dies hat im Rahmen der Translation zur Folge, dass im Falle des SMN2 Transkripts nur etwa 10% des intakten volllängen Proteins entstehen. Nur dies ist funktionsfähig. Die trunkierte Version ohne die in Exon7 kodierten Areale ist hoch instabil und funktionell nicht von Bedeutung. Dies illustriert sehr gut, dass je mehr Kopien des SMN2 Gens vorliegen, die Menge an intaktem SMN-Protein höher ist. (Abkürzungen: SMN: survival motoneuron; eigene Abbildung)

1.2.3 Genetik der spinalen Muskelatrophie – Ursache der SMA

Ein Verlust relevanter Anteile des SMN1-Genprodukts ist ursächlich für die Spinale Muskelatrophie. Man geht aktuell davon aus, dass in etwa 92-95% der SMA Fälle homozygote Deletionen, als Folge nicht homologer Rekombinationen im Rahmen der Meiose, im Bereich des Exon 7 und 8 vorliegen. Dies führt zu einem Mangel an intaktem SMN-Protein, welcher nicht hinreichend durch das SMN2-Gen kompensiert werden kann (Brahe, Servidei et al. 1995, Hahnen, Forkert et al. 1995, Wirth, Herz et al. 1999, Wirth 2000). Darüber hinaus sind in bis zu 5% der Fälle subtilere Mutationen beschrieben. Des Weiteren existieren vereinzelt Fälle, bei denen sich aktuell keine Mutationen nachweisen lassen (Wirth 2000). Innerhalb der Erkrankungsformen SMA 0 bis IV liegen häufig unterschiedliche Alterationen in der Gensequenz des SMN1-Gens vor. Im Falle der SMA Typ I treten überwiegend Deletionen im Bereich des Exons 7 und 8 auf. Im Falle der SMA Typ II bis IV liegen häufig Mutationen vor, welche zu einer Konversion des SMN1-Gens in das SMN2-Gen führen.

Somit liegt hier zumindest verhältnismäßig eine höhere Menge an SMN-Protein im Vergleich zu SMA-Typ I vor, was als Erklärung für den milderen Verlauf angenommen wird (Monani, Lorson et al. 1999, Jablonka, Rossoll et al. 2000, Jablonka, Schrank et al. 2000, Le, Coover et al. 2000, Monani, Sendtner et al. 2000, Jablonka and Sendtner 2003) (Abb.2).

Das Verständnis dieser speziellen genetischen Situation des Menschen, mit Vorliegen von zwei funktionell unterschiedlichen Versionen eines Gens, ist essentiell für das Verständnis des Gendosis-Effektes im Falle der spinalen Muskelatrophie. In groß angelegten Studien, welche den Gehalt an SMN-Protein im Falle der einzelnen Erkrankungsverläufe analysiert haben, konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Erkrankung von der Menge an intaktem SMN-Protein abhängig ist (Burghes 1997, DiDonato, Ingraham et al. 1997, Parsons, McAndrew et al. 1998). Ist das SMN1-Gen nicht mehr vorhanden, bestimmt die Menge an Kopien des SMN2-Gens, wie viel intaktes SMN-Protein letztlich vorliegt.

Umgekehrt formuliert bedeutet dies, je weniger Kopien des SMN2-Gens vorhanden sind, desto schlechter kann der Verlust des SMN1-Gens kompensiert werden (Feldkotter, Schwarzer et al. 2002, Harada, Sutomo et al. 2002, Prior, Swoboda et al. 2004, Yamashita, Nishio et al. 2004, Cusco, Barcelo et al. 2006). Insgesamt sind die Werte für die Anzahl der Kopien in den einzelnen Erkrankungsgruppen, in den unterschiedlichen Studien nicht gänzlich einheitlich. Die Literaturanalyse ergibt, dass etwa 87% der Patienten mit SMA Typ I maximal zwei Kopien des SMN2-Gens besitzen. Die Patienten mit SMA Typ II besitzen im Gegensatz dazu in 86% zwei oder mehr Kopien. Patienten mit SMA Typ III besitzen in etwa 87% der Fälle drei oder mehr Kopien. Bei den Subtypen III und IV sind praktisch keine Fälle mit nur einer Kopie bekannt (Cusco, Barcelo et al. 2006).

1.2.4 Genetik der spinalen Muskelatrophie – Das SMN-Protein

Das SMN-Gen wird in eine mRNA von 1,5kb transkribiert. Diese wird dann in das volllängen SMN-Protein translatiert, welches ubiquitär im Cytoplasma und Zellkern vorkommt. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt etwa 38kDa bei einer Länge von insgesamt 294 Aminosäuren (Liu and Dreyfuss 1996, Schmalbruch and Lewis 2000, Schmalbruch and Haase 2001). Es konnte bis jetzt in unterschiedlicher Konzentration in Geweben wie der Lunge, der Leber, den Nieren, dem Herzen, dem Skelettmuskel und in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden (Lefebvre, Burglen

et al. 1995, Lefebvre, Bulet et al. 1997, Novelli, Calza et al. 1997, Bulet, Huber et al. 1998, Schmalbruch and Haase 2001). Die Struktur des SMN-Proteins ist hoch konserviert. Sie lässt sich beispielsweise in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (Miguel-Aliaga, Chan et al. 2000), dem Rundwurm (*Caenorhabditis elegans*) (Miguel-Aliaga, Culetto et al. 1999) und vor allem auch in der Maus (*Mus musculus*) wiederfinden (Schrank, Gotz et al. 1997).

Im Rahmen der Differenzierung der Gewebe nimmt die Menge des SMN-Proteins im ab (Jablonka, Rossoll et al. 2000, Jablonka, Bandilla et al. 2001). Im Vergleich der Gewebearten konnten besonders hohe Konzentrationen des SMN-Proteins im zentralen Nervensystem und hier vor allem in den Motoneuronen des Rückenmarks nachgewiesen werden (Battaglia, Princivalle et al. 1997). In Geweben von Patienten mit SMA ist die Gesamtmenge an SMN-Protein deutlich reduziert, wobei insbesondere das Rückenmark stark betroffen ist (Wirth et al., 2000, Coover et al., 1997). Der absolute Verlust an SMN-Protein ist bei Patienten mit SMA Typ I größer als bei Typ II oder III (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). Die Wichtigkeit des SMN-Proteins wird noch deutlicher, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass der komplette „knock-out“ des SMN-Gens bereits im frühen Embryonalstadium letal ist (Schrank, Gotz et al. 1997). Eine detaillierte Analyse der Gensequenz, insbesondere der Region von 2kb oberhalb der 5' Region konnte zeigen, dass die Promotorsequenzen der beiden SMN-Gene nahezu identisch sind. Auch die Aktivität der beiden Regionen unterscheidet sich in den Untersuchungen quasi nicht. Die Promotorsequenz liegt zwischen den Basen 441 und 228.

Störungen in dieser Region im Sinne einer verminderten Aktivität bzw. einer Alteration der Promotorsequenz haben eine veränderte Transkription zur Folge und sind somit sehr unwahrscheinlich als Auslöser der spinalen Muskelatrophie, da sie in beiden Genen auftreten müssten (Echaniz-Laguna, Miniou et al. 1999, Monani, McPherson et al. 1999). Betrachtet man die Verteilung des SMN-Proteins in der einzelnen Zelle, so lässt sich das Protein sowohl innerhalb des Zellkörpers, als auch innerhalb des Zellkerns nachweisen (Liu and Dreyfuss 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich das SMN-Protein im Nucleus in speziellen Zellkörpern befindet. Herausgearbeitet wurde, dass diese häufig mit den sogenannten coiled bodies (Cajal bodies) kolokalisieren. Diese spielen eine wesentliche Rolle beim Spleißvorgang. Daher werden die Zellkörper als „gemini of coiled bodies“ oder kurz „gem bodies“ bezeichnet. Die Größe dieser Zellkörper wird auf etwa 0,1 bis 1,0 µm geschätzt. Die genaue

Funktion dieser „gemini of coiled bodies“ ist jedoch bis dato noch nicht abschließend bekannt. Es wird postuliert, dass eben diese „gemini of coiled bodies“ Funktionen bei der Assemblierung von Strukturen für die Transkription eine Rolle spielen (Gall 2000). Dies entspricht in Teilen der Funktion von coiled bodies, welche dynamische Strukturen darstellen, deren Formation überwiegend in der Inter- und M-Phase stattfindet. Aus diesem Grund ist es ebenfalls weiterhin noch fraglich, ob es sich bei den „gem bodies“ tatsächlich um eigenständige Zellkörper handelt oder sie vielmehr als Teil der coiled bodies zu betrachten sind, da diese immer direkt assoziiert sind. Die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Girard legen nahe, dass wenn es sich um eigenständige Körper handelt, diese in ihrer Funktion stark assoziiert sind (Cooper, Cushnaghan et al. 1992, Girard, Neel et al. 2006). In Abwesenheit des SMN-Proteins scheint die Assemblierung der „gem bodies“ gestört zu sein (Covert, Le et al. 1997, Girard, Neel et al. 2006).

1.2.5 Relevanz des SMN-Proteins in neuronalen Strukturen

Eine wesentliche Frage, welche man sich im Zuge der Krankheitstheorie der spinalen Muskelatrophie immer wieder stellte, war, warum eine Alteration eines ubiquitär exprimierten Proteins letztlich „nur“ als Motoneuronenerkrankungen klinisch apparent wird.

Erste Arbeiten an isolierten Rückenmarkspräparaten an Embryonaltag 13,5 zeigten eine hohe Konzentration des SMN-Proteins.

Auch in Präparaten des Hirnstammes und des übrigen zentralen Nervensystems ließen sich hohe Konzentrationen nachweisen (Bechade, Rostaing et al. 1999). Auf diesen Ergebnissen aufbauend, konnte gezeigt werden, dass das SMN-Protein zusätzlich entlang der Axone nachweisbar ist. In Untersuchungen von Präparaten unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigte sich, dass die Menge und Lokalisation des SMN-Proteins je nach Entwicklungszeitpunkt variiert (Pagliardini, Giavazzi et al. 2000).

Die Ergebnisse legen nahe, dass das SMN-Protein und assoziierte Bindungspartner (z.B. SIP1 - stress induced protein 1) im Laufe der neuronalen Entwicklung entlang des Axons transportiert werden. In Kombination mit der wichtigen Funktion des SMN-Proteins im Rahmen des Spleißprozesses von prä-mRNA spielt es somit mutmaßlich auch eine wichtige Rolle beim Transport von mRNA über das Axon. Folge eines gestörten SMN-Haushaltes können somit lokale Translationsstörungen sein

(Pellizzoni, Kataoka et al. 1998, Pagliardini, Giavazzi et al. 2000). Diese Hypothese würde die resultierenden Entwicklungsstörungen des neuronalen Systems erklären. Die Verteilung des SMN-Proteins variiert zudem im Laufe der postnatalen Entwicklung. Initial zeigen sich in der direkt postnatalen Phase hohe SMN-Protein Konzentrationen im Nucleus. Im Rahmen der Entwicklung konnte das SMN-Protein dann in späteren Stadien vor allem auch in Wachstumskegeln von Neuronen und Ausläufern der Gliazellen nachgewiesen werden (Fan and Simard 2002). Es konnte in diesen Studien ebenfalls gezeigt werden, dass im Falle der Depletion des SMN-Proteins die Differenzierung der muskulären Endplatte nach dem dritten postnatalen Tag wesentlich gestört ist. Das SMN-Protein spielt somit eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Motoneurone und bei der Etablierung der muskulären Endplatte. Untersuchungen an humanen Proben durch Giavazzi et al. konnten zeigen, dass das SMN-Protein auch im Menschen bereits sehr früh exprimiert wird. Der früheste Zeitpunkt des Nachweises von SMN-Protein liegt bei sechs Wochen und drei Tagen der Embryonalentwicklung.

Zu diesem Zeitpunkt liegt auch in der humanen Situation noch keine Prädominanz einzelner Zelltypen bezüglich der Verteilung des SMN-Proteins vor. Das Protein befindet sich zu diesem frühen Zeitpunkt fast ausschließlich im Zellkern. Nach der 14. Embryonalwoche kommt es im sich entwickelnden Neuron zu einem Shift in der Lokalisation, hin zu einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins. Nach etwa 22 Wochen kommt es zum Auswachsen der Axone der Motoneurone in das Vorderhorn. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich das SMN-Protein dann in relevanter Konzentration in den Axonen detektieren. Während das Protein anfangs ubiquitär auftaucht, kommt es neben der veränderten Lokalisation des SMN-Proteins auch zu einer Prädominanz des SMN-Proteins in neuronalen Zellen und hier vor allem in Motoneuronen (Pagliardini, Giavazzi et al. 2000, Giavazzi, Setola et al. 2006).

Interessanterweise ist das trunkierte SMN-Protein im Gegensatz zum volllängigen SMN-Protein ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Es wird somit vermutet, dass die korrekte Lokalisation des Proteins bzw. die Fähigkeit eines Neurons, das SMN-Protein über das Axon zu transportieren, von dem Vorhandensein des Exon 7 des SMN-Gens abhängig ist. Der korrekte axonale Transport des Proteins scheint somit ein essentieller Faktor in der Differenzierung der Neurone und vor allem Motoneurone zu sein.

1.2.6 Interaktion des SMN-Proteins - Krankheitstheorie der spinalen Muskelatrophie

Für die Integrität der neuromuskulären Endplatte und des Wachstumskegels ist die lokale Translation von mRNA von entscheidender Bedeutung. So erscheint es zunächst logisch, dass das SMN-Protein als Teil des sogenannten SMN-Komplexes am Splicing-Prozess beteiligt ist. Der Komplex setzt sich aus dem SMN-Protein und zahlreichen Interaktionspartnern zusammen (Liu and Dreyfuss 1996, Liu, Siomi et al. 1996). Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass im Falle der trunkierten SMN-Variante mit fehlendem Exon 7 die Assemblierung des SMN-Komplexes stark beeinträchtigt ist (Lorson, Strasswimmer et al. 1998, Lorson, Hahnen et al. 1999). Interessanterweise scheint hierfür nur der Austausch einer einzelnen Base, nämlich Cytosin zu Thymin, verantwortlich zu sein (Lorson, Hahnen et al. 1999).

Zusätzlich zu der Assemblierung mehrerer SMN-Proteine beinhaltet der SMN-Komplex noch zahlreiche weitere interagierende Proteine. Diese werden heutzutage als Gemin subsummiert. Insgesamt wurden sieben verschiedene Varianten, Gemin 2-8, innerhalb des SMN-Komplexes identifiziert (Charroux, Pellizzoni et al. 1999, Charroux, Pellizzoni et al. 2000, Pellizzoni, Baccon et al. 2001, Baccon, Pellizzoni et al. 2002, Carissimi, Saieva et al. 2006).

Der für die Krankheitsentwicklung der spinalen Muskelatrophie bedeutendste Interaktionspartner, zumindest nach heutigem Verständnis, scheint Gemin 2 zu sein. Dieses zunächst als „SMN Interacting Protein 1“ bezeichnete Protein wurde, nachdem weitere Bindungspartner identifiziert wurden, in Gemin 2 umbenannt.

Interessant ist, dass die Verteilung dieses Proteins, welches am aminoterminalen Ende des SMN-Proteins bindet, mit der des SMN-Proteins korreliert. Dies gilt nicht nur für die adulte Situation, sondern auch für die Verteilung im Laufe der embryonalen Entwicklung. Zusätzlich ist im Falle der spinalen Muskelatrophie die Proteinmenge des SMN-Proteins und des Gemin 2 proportional reduziert (Liu, Siomi et al. 1996, Liu, Fischer et al. 1997). Mittlerweile konnte die Kolo-kalisation der beiden Proteine sowohl innerhalb des Nucleus, des Zytoplasmas, als auch entlang des Axons und der Axonterminalen verifiziert werden (Jablonka, Bandilla et al. 2001, Sharma, Lambrechts et al. 2005). Der intakte SMN-Komplex ist Bestandteil des Spleißapparates der Zellen (Fischer, Liu et al. 1997). Das SMN-Protein scheint hier eine Rolle bei der Assemblierung von snRNP zu spielen. Der knock-out des SMN-Gens ist bereits im Embryonalstadium letal, passend zu der Idee, dass der SMN-Komplex eine

wesentliche Rolle im Rahmen des prä-mRNA Spleißens spielt (Liu and Dreyfuss 1996, Fischer, Liu et al. 1997, Pellizzoni, Kataoka et al. 1998, Meister, Eggert et al. 2002). Es ist allerdings weiterhin unklar ob und inwieweit die Transkripte des SMN2-Gens in der Lage sind diesen Spleißdefekt zu kompensieren. Vielmehr legen aktuelle Untersuchungen nahe, dass eine funktionelle Wiederherstellung des Spleißapparates nicht zu einer restitutio des Phänotyps der spinalen Muskelatrophie führt. Aus diesem Grund hat man die Theorie, dass der SMA als alleinige Ursache ein Defekt in der Prozessierung der prä-mRNA zugrunde liegt, weitestgehend wieder verlassen (Van Alstyne, Lotti et al. 2018, Van Alstyne, Simon et al. 2018).

Im Rahmen von Untersuchungen an Tiermodellen, bei denen eine Axotomie, d.h. eine Durchtrennung des Axons, der Motoneurone durchgeführt wurde, fiel auf, dass hieraus Krankheitsbilder resultierten, die der spinalen Muskelatrophie ähneln (Crawford and Pardo 1996).

So wurde die Theorie entwickelt, dass es sich bei der SMA eher um eine retrograde Degeneration des Neurons handelt, welche von den distalen Axonen ausgeht.

Diese Theorie konnte durch zahlreiche Untersuchungen unterstützt werden. Als Ausdruck des Problems des terminalen Axons konnte gezeigt werden, dass die Menge von Strukturproteinen wie β -Aktin innerhalb des terminalen Axons reduziert ist (Rossoll, Jablonka et al. 2003).

Dies ist ein essentieller Bestandteil der Integrität der neuromuskulären Endplatte. Weiterhin konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, dass auch die Organisation der für die synaptische Transmission relevanten $Ca_v2.2$ Kalziumkanäle gestört ist. Dies resultiert in der Reduktion spontaner Kalziumtransienten als Ausdruck einer beeinträchtigten Erregbarkeit der Axonterminalen und somit einer gestörten Funktion der neuromuskulären Endplatte.

Das Fehlen spezifischer Differenzierungssignale, durch alterierte lokale Kalziumströme aber auch durch den fehlenden Einfluss neurotropher Faktoren wie BDNF, wird heutzutage als Ursache der retrograden axonalen Degeneration angenommen (Jablonka, Beck et al. 2007, Dombert, Balk et al. 2017). Neben gentherapeutischen Ansätzen, welche die Erhöhung der Menge an intaktem SMN-Protein zum Ziel haben, ist daher die Beeinflussung der Kalziumströme am Axonterminus ein vielversprechender Ansatz in der Therapie der spinalen Muskelatrophie.

1.2.7 Tiermodelle

Die Untersuchung der Wirksamkeit von Substanzen wie R-Roscovitine für den Einsatz im Falle der spinalen Muskelatrophie erfordert ein geeignetes Tiermodell.

Wie bereits beschrieben, ist das SMN-Gen über die Evolution hochkonserviert. Viollet und Donato et al. konnten zeigen, dass das in der Maus vorliegende SMN-Gen zu über 80% dem menschlichen SMN1-Gen ähnelt. Im Gegensatz zur humanen Situation besitzt die Maus allerdings kein Duplikat. Ein knock-out des murinen SMN-Gens auf beiden Allelen ist somit bereits intrauterin letal (DiDonato, Ingraham et al. 1997). Um eine Untersuchung der spinalen Muskelatrophie im Mausmodell zu ermöglichen, wurde ein transgenes Modell erarbeitet. Man hat in ein homozygotes knock-out Tier zwei Kopien des humanen SMN2-Proteins transferiert. Die resultierenden *Smn*^{-/-}; *SMN2* Tiere produzieren ausreichend funktionsfähiges SMN-Protein, sodass die Tiere im Durchschnitt etwa sechs Tage postpartum überleben. Tiere die nur eine Kopie des SMN2-Gens enthalten, überleben dahingegen nur wenige Stunden postpartum. Dies stellt eine Analogie zum Gen-Dosis-Effekt im Falle der humanen spinalen Muskelatrophie dar (Monani, Sendtner et al. 2000, Monani, Pastore et al. 2003). Die Untersuchung der auftretenden Pathologien in diesem Modellsystem, sowohl histologisch als auch in der Analyse des Verhaltens der Motoneurone in vitro, zeigt eine ausgeprägte Analogie zur humanen Situation der Spinalen Muskelatrophie Typ 1. Auch der Phänotyp ist mit deutlicher Hypotrophie der Tiere, reduzierten Spontanbewegungen und globaler Schwäche, ähnlich der Situation im Menschen (Hsieh-Li, Chang et al. 2000, Monani, Sendtner et al. 2000). Um auch die milderen Verlaufsformen der SMA im Tiermodell untersuchen zu können, wurden Modelle entwickelt, die durch Kreuzen von Tieren mit einer schweren Verlaufsform und Tieren mit dem Vorliegen des SMN2-Proteins ohne Exon 7 (*SMN Δ 7*) eine erhöhte Menge des SMN-Proteins aufweisen (Le, Pham et al. 2005).

1.3 Aktuelle und zukünftige Behandlungsansätze der SMA

Insgesamt ergeben sich viele Ansätze in der Therapie der spinalen Muskelatrophie. Grob kann man diese unterscheiden in Ansätze, welche die Menge an intaktem SMN-Protein erhöhen sollen, und Ansätze, welche direkt die gestörte Signaltransmission im Bereich der neuromuskulären Endplatte adressieren. Darüber hinaus gibt es generell neuroprotektive Ansätze, die nicht spezifisch für die Therapie der spinalen Muskelatrophie sind. Erst das Verständnis der Pathologie und die Identifikation des SMN-Gens ließen es zu, gezielte Strategien zu erarbeiten. Nichtsdestotrotz spielen symptomatische Therapien auch heutzutage noch eine relevante Rolle.

Allgemein neuroprotektive Ansätze

Als erste Substanzen zur Neuroprotektion wurden die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF erprobt. Insgesamt zeigte sich eine deutliche Diskrepanz in der Effektivität der neurotrophen Faktoren zwischen dem in vitro- und in vivo-Einsatz. Während innerhalb von Zellkulturen ein durchaus positiver Effekt auf das Überleben der Neurone beschrieben wurde, konnte dieser Effekt in zahlreichen klinischen Studien nicht in dem Ausmaß nachvollzogen werden (Linker, Maurer et al. 2002, Thoenen and Sendtner 2002).

Neben den klassischen neurotrophen Faktoren existieren weitere Substanzen, welche in vitro neuroprotektive Wirkung hatten. Hier spielt unter anderem der Natriumkanalblocker Riluzol, welcher antiglutamaterge Wirkung hat, eine wichtige Rolle, da die Behandlung mit diesem Wirkstoff bereits in der Amyotrophen Lateralsklerose die Krankheitsprogression verlangsamt. Insgesamt konnte aber keine der klinischen Studien einen signifikanten Effekt für Riluzol in der Therapie der SMA nachweisen ([www.clinicaltrials.gov NCT00774423](http://www.clinicaltrials.gov/NCT00774423)).

Phase II und III Studien, unter anderem an der LMU, zeigten insgesamt positive Ergebnisse. Die Erwartungen an das Medikament konnten aber keineswegs erfüllt werden. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse mit dem antisense Oligonukleotid Nusinersen wurden weitere Studien durch die Firma bis dato nicht angestrebt (Kaviani, Keshtkar et al. 2019, Weber, Clemensson et al. 2019).

Erhöhung der SMN-Proteinmenge

Die Ursache für die spinale Muskelatrophie ist, wie bereits dargelegt, eine verringerte Menge und alterierte Verteilung an intaktem SMN-Protein. Daher leuchtet es ein, dass sich wesentliche Therapieansätze mit der Erhöhung der Menge an intaktem SMN-Protein befassen. Prinzipiell gibt es hier verschiedene Ansatzpunkte. Zum einen verfolgt man die Idee, durch Modifikation der Translation bzw. Transkription des SMN2-Gens, die Menge an SMN-Protein zu steigern. Insbesondere wird hier versucht, den Spleißvorgang, welcher als Produkt das trunkierte SMN Protein hat, zu supprimieren. Aber auch die absolute Stimulation der SMN2-Transkription stellt einen möglichen Ansatzpunkt dar.

Oligonukleotide

Bereits seit den 2000er Jahren werden erste Versuche mit antisense Oligonukleotiden durchgeführt. Der Wirkmechanismus ist durch einen direkten Eingriff in den Spleißvorgang bedingt. Durch Interaktion mit der 3' Splicing site, vor allem im Exon 8, kommt es in vitro zu einer Erhöhung der SMN-Proteinmenge, da eine geringere Skipping Rate des Exon 7 resultiert (Lim and Hertel 2001). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Applikation von bifunktionellen RNAs, welche im Bereich des Exon 7 binden, den Spleißvorgang des Exon 7 modulieren können, was in vitro zu einer erhöhten Menge an funktionellem SMN-Protein führt. Darüber hinaus konnte eine verminderten Apoptose Rate von Motoneuronen in einem SMA-Typ III Modell beobachtet werden (Hua, Sahashi et al. 2010; Baughan, Dickson et al. 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Nusinersen (Spinraza®) als erstes antisense Nukleotid 2016 in den USA und 2017 in Europa zugelassen. Erste positive Ergebnisse wurden unter anderem 2019 in Frankfurt vorgestellt. Die Substanz wird intrathekal verabreicht und ist mittlerweile in Deutschland zugelassen (Finkel, McDermott et al. 2014, Finkel, Mercuri et al. 2017, Hoy 2017, Hoy 2018, Wurster and Gunther 2020). Eine weitere vielversprechende Substanz ist Risdiplam, welche zur Gruppe der „small molecules“ gehört und eine Nachfolgesubstanz von RG7800 darstellt, welche als erste Substanz dieser Klasse in klinischen Studien erprobt wurde (Ratni, Karp et al. 2016). Auch wenn innerhalb der ersten Phase keine Nebenwirkungen auftraten, zweifelte man an der Sicherheit von RG7800 aufgrund von Untersuchungen, welche an Affen durchgeführt wurden. Der Wirkmechanismus ist dem des Oligonukleotids Nusinersen ähnlich, denn auch hier beruht die Wirkung auf einer Modifikation des Spleißvorgangs

von Exon 7, umso die Menge an funktionsfähigem SMN-Protein zu erhöhen (Hua, Vickers et al. 2008, Naryshkin, Weetall et al. 2014, Sivaramakrishnan, McCarthy et al. 2017). Risdiplam ist eine Weiterentwicklung der Initialsubstanz mit besseren humanen pharmakokinetischen Eigenschaften und einer verbesserten Wirksamkeit bezogen auf die Modifikation des Spleißvorgangs. Zusätzlich gibt es weniger Interaktionen mit dem multidrug resistance protein1 (MDR1). Die Applikation kann oral erfolgen. Es laufen zurzeit klinische Studien und eine Zulassung durch die FDA wird aufgrund der aktuellen Ergebnisse erwartet (Poirier, Weetall et al. 2018, Sturm, Gunther et al. 2019). Neben Risdiplam befinden sich zahlreiche weitere small molecules in der präklinischen Erprobung (CureSMA).

Muskelprotektion

Ein weiterer Ansatz ist die medikamentöse Protektion des Skelettmuskels. Ziel dieser Therapie ist eine Verlangsamung der Muskelatrophie bis hin zur partiellen restitutio der Muskelmasse mit Erhalt der muskulären Funktion. Da dieser Ansatz sich von dem der Beeinflussung des Spleißvorgangs unterscheidet, besteht hier sogar die Möglichkeit der Kombination beider Therapieoptionen.

Zurzeit befinden sich zwei Substanzen, die auf dieser Ebene wirken, in der klinischen Erprobung.

Zum einen ist dies die von Cytokinetics/Astellas entwickelte Substanz Reldesemtiv (früher CK-2127107). Die Substanz wirkt über eine Modulation des sogenannten „regulator troponin complex“ des Skelettmuskels. Dies führt zu einer veränderten Kalziumkonzentration in der Zelle und führt somit unabhängig vom eingehenden neuronalen Signal zu einer verstärkten Muskelkontraktion. Zurzeit laufen Phase 2 Studien mit SMA Typ 2-4 Patienten über 12 Jahren.

Eine weitere Substanz ist SRK-015 (Scholar Rock), welche über eine selektive Inhibition von Myostatin wirkt. Myostatin wird von Muskelzellen freigesetzt und hat über autokrine Signalweiterleitung eine Inhibition der Myogenese zur Folge. Es wird somit eine positive Wirkung bezogen auf Muskelstärke und Muskelmasse postuliert.

In der ersten Hälfte von 2019 wurde die Phase 2 der klinischen Erprobung begonnen (Scholar Rock).

Stammzelltherapie und Gentherapie

Wesentliche Ansätze zur Therapie der spinalen Muskelatrophie liegen im gentherapeutischen Sektor. Dies liegt nahe, da es sich hier um Ansätze handelt, die das kausale Problem der spinalen Muskelatrophie adressieren. Bereits 2004 gab es Versuche, das defekte bzw. fehlende SMN-1 Gen mittels eines lentiviralen Vektors (AAV1) zu ersetzen (Azzouz, Le et al. 2004). Dieser Ansatz wurde mehrfach modifiziert, insbesondere hinsichtlich des Applikationswegs des Virus. Wurde das Virus zunächst intramuskulär injiziert, erfolgten bald Versuche mit einer intrathekalen Applikation und einer direkt postnatalen intravenösen Injektion. Insgesamt führten alle Ansätze im Tiermodell zu einem signifikanten Anstieg der Menge an funktionalem SMN-Protein und zu einer Restitutio der muskulären Defizite (Passini, Bu et al. 2010, Dominguez, Marais et al. 2011). In der Weiterentwicklung dieser Konzepte wurde das Medikament Zolgensma entwickelt, welches mittlerweile durch die FDA für die Therapie von Kindern unter 2 Jahren mit SMA zugelassen ist. Prinzip ist hier, dass das SMN1-Gen über einen AAV9 Vektor direkt in die α -Motoneurone gelangt. Dies ist aufgrund des Tropismus des AAV9 für neuronale Zellen möglich. Das Ersatz-Gen liegt als separates Chromosom im Zellkern vor. In der Altersgruppe der unter Zweijährigen, ist Zolgensma in der Lage die Bluthirnschranke zu passieren (Mendell, Al-Zaidy et al. 2017, Wurster and Gunther 2020). Die Therapie mit Zolgensma führte zu einer deutlichen Verbesserung des Phänotyps in der Altersgruppe der unter Zweijährigen. Limitationen der Therapie sind die Möglichkeit der Entwicklung von Antikörpern im Verlauf der Therapie und eine eingeschränkte Passierbarkeit der Bluthirnschranke in der Gruppe der über Zweijährigen (2019, 2019, Keeler and Flotte 2019, Wurster and Gunther 2020).

Neben der vektorbasierten Gentherapie gibt es auch Untersuchungen zum Einsatz von pluripotenten Stammzellen, sowie auch zum Transfer von Motoneuronen. Insgesamt ist die Datenlage hier noch uneinheitlich. Einzelne Studien konnten jedoch einen positiven Effekt der Transplantation von isolierten Motoneuronen nachweisen. Gleiches gilt für die Applikation von Stammzellen im Mausmodell. Klinische Studien fehlen hier zwar noch weitestgehend, es gibt jedoch Untersuchungen, zum Beispiel im Falle von apoplektischen Insulten, die eine Wirksamkeit der Applikation von Stammzellen belegen im Hinblick auf die Neuroregeneration besitzen (Bersano, Ballabio et al. 2010, Corti, Nizzardo et al. 2010).

1.4 Die Rolle der Kalziumkanäle im Rahmen der Differenzierung von Motoneuronen im Kontext der spinalen Muskelatrophie

1.4.1 Kalziumkanäle und Differenzierung von Motoneuronen

Der Wachstumskegel als distales Ende des Axons stellt ein hochspezialisiertes Areal dar. Er ist essentiell für die Differenzierung der Neurone und die Zell-Zell-Interaktion. Für den Erhalt dieser Struktur ist die Integrität des Zytoskeletts essentiell. Dies kann nur durch einen regulierten mRNA-Transport entlang des Axons, sowie eine adäquate mRNA-Translation im Wachstumskegel gewährleistet werden (Crino and Eberwine 1996, Mohr and Richter 2001). Neben dem Nachweis von mRNA im Wachstumskegel lassen sich auch die translatierten Proteine in diesen Bereichen nachweisen, was für die lokale Translation von mRNA in diesen Abschnitten spricht. Neben zahlreichen anderen Proteinen konnte vor allem β -Aktin als wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts nachgewiesen werden. Es ist entscheidend an der Formation der muskulären Endplatte beteiligt (Kislauskis, Zhu et al. 1997, Rossoll, Jablonka et al. 2003, Moradi, Sivadasan et al. 2017).

Innerhalb des distalen Axons spielen bei der Verarbeitung von Differenzierungssignalen insbesondere spannungsgesteuerte Kalziumkanäle eine entscheidende Rolle (Gu, Olson et al. 1994, Gu and Spitzer 1995). Im Falle der Motoneurone sind vor allem Kanäle des Typs $Ca_v2.1$ (P/Q-Typ- Kalziumkanäle) und des Typs $Ca_v2.2$ (N-Typ-Kalziumkanäle) von entscheidender Bedeutung (Westenbroek, Bausch et al. 1998, Westenbroek, Hoskins et al. 1998). Die N-Typ-Kalziumkanäle spielen dabei vor allem im Rahmen der Motoneuronentwicklung eine wichtige Rolle. Die P/Q-Typ-Kalziumkanäle hingegen spielen auch im weiteren Verlauf bei der synaptischen Transmission im Bereich der aktiven Zonen eine entscheidende Rolle. (Abb. 3)

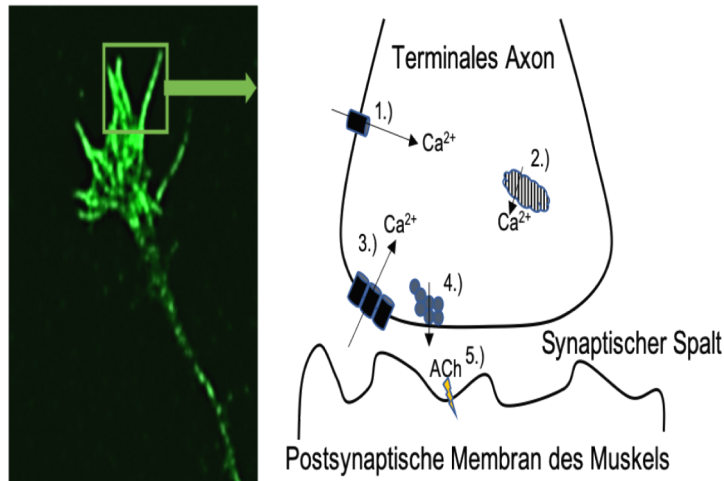


Abbildung 3: Schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte und der relevanten Kalziumströme

Links ist eine eigene fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Wachstumskegels eines kultivierten Motoneurons dargestellt. Auffällig sind die Verzweigungen zur Vergrößerung der Membranoberfläche im Bereich des terminalen Axons. Die Färbung erfolgte in diesem Fall gegen das Strukturprotein β -Aktin. Rechts ist dann ein vergrößerter Ausschnitt des terminalen Axons mit korrespondierender postsynaptischer Membran des Muskels schematisch illustriert. Diese Situation ähnelt grob der an der neuromuskulären Endplatte. Der spontane Einstrom von Kalzium über entsprechende Kalziumkanäle führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (1.). Dies führt zu einer weiteren Liberation von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (2.). Dieser intrazelluläre Anstieg der Kalziumkonzentration hat in Summe zur Folge, dass sich Kalziumkanäle zu „Clustern“ zusammenlagern können, über die dann größere Mengen an Kalzium-Kationen in die Zelle gelangen können (3.). Daraufhin kommt es zum Docking von Vesikeln im Bereich der aktiven Zonen (4.). Dies sind hochspezialisierte Areale, in welchen es dann zur Liberation von Neurotransmittern wie Acetylcholin (ACh) kommt. Dies führt dann zur Signalweiterleitung (gelber Blitz) über die postsynaptische Membran des Muskels (5.). (■ - schematische Darstellung des Kalziumkanals; ▨ - schematische Darstellung des endoplasmatischen Retikulums; ● - schematische Darstellung eines Vesikels) (eigene Abbildung)

Die aktiven Zonen sind spezialisierte Bereiche in denen Neurotransmitter freigesetzt und Differenzierungssignale verarbeitet werden. Grundlage ist ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies führt zu einer weiteren Assemblierung von Kalziumkanälen am Ort der geänderten Kalziumkonzentration und somit letztendlich zu einer weiteren Erhöhung der Kalziumkonzentration, denn erst ab einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration um etwa 200nmol, erfolgt eine Freisetzung synaptischer Vesikel (Heidelberger, Heinemann et al. 1994, Jablonka, Beck et al. 2007) (Abb.3). Der wesentliche Unterschied zwischen den N-Typ- und P/Q-Typ-Kanälen liegt hierbei im Schwellenwert, welcher zur Öffnung der Pore führt, denn die Kanäle des P/Q-Typs öffnen bereits bei deutlich niedrigeren Spannungen. Der ausreichende intrazelluläre Kalziumanstieg führt in letzter Konsequenz zu einer Liberation der Neurotransmitter und somit zur synaptischen Transmission (Khanna, Li et al. 2007). Aber nicht nur die Öffnung verläuft spannungsabhängig, auch die Inaktivierung der Kanäle ist abhängig von der Spannung (Catterall, Perez-Reyes et al.

2005). Wie bereits dargelegt, ist eine spezifische Anordnung der aktiven Zone von essentieller Bedeutung. Als aktive Zonen werden hochspezialisierte Areale im Bereich der muskulären Endplatte bezeichnet, an welchen die synaptische Transmission über die Exozytose von transmitterbeladenen Vesikeln stattfindet. Erste nähere Analysen wurden bereits in den 70er Jahren durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass die aktiven Zonen immer einem postsynaptischen Areal gegenüberliegen, welches als „postsynaptic density“ (PSD) bezeichnet wird und in dem die Rezeptoren für die Signalweiterleitung lokalisiert sind. Der „Spalt“ zwischen aktiver Zone und PSD wird auf nur etwa 30nm geschätzt (Landis, Hall et al. 1988). Mit der Etablierung der Elektronenmikroskopie, ist es heute möglich, die aktiven Zonen näher zu charakterisieren. Stark vereinfacht kann man die aktiven Zonen auf drei Komponenten reduzieren (Zhai and Bellen 2004) (Abb.3):

1. Plasmamembran, an der es zur Fusion von Vesikeln kommt.
2. Zytoplasma/Zytomatrix unmittelbar im Bereich der aktiven Zone, an der das Docking der Vesikel stattfindet.
3. Zellmatrixproteine, welche die Plasmamembran mit dem Zytoplasma verbinden und an dem die beladenen Vesikel lokalisiert sind.

Innerhalb der Organisation der aktiven Zone spielen vor allem Laminine eine wichtige Rolle. Zusammen mit zahlreichen „aktive Zone“-Proteine, wie z.B. CAST (cytomatrix of the active zone-associated structural protein), welches unter anderem mit dem präsynaptischen Protein Bassoon interagiert, sorgen Laminine für eine korrekte Anordnung der Kalziumkanäle (Kittel, Wichmann et al. 2006).

Um die Funktion der Kalziumkanäle besser nachzuvollziehen, ist das Verständnis der Funktion der einzelnen Untereinheiten unerlässlich. (Abb. 4)

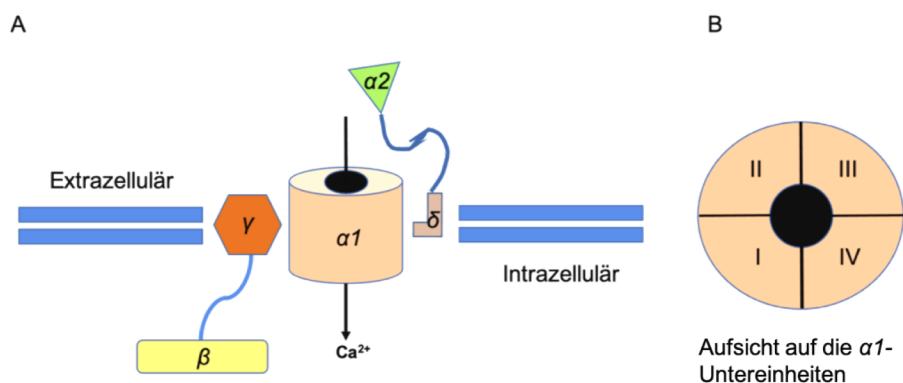


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur eines spannungsabhängigen Kalziumkanals.

A) Der Kalziumkanal ist über die vier $\alpha 1$ -Untereinheit in die Membran integriert. Die $\alpha 1$ -Untereinheiten sind nochmals aus 6 Untereinheiten (S1-6) aufgebaut. Vier $\alpha 1$ -Untereinheiten (I-IV) bilden im Wesentlichen die Pore, durch welche die Kalzium-Kationen über die Membran strömen (B). Die extrazellulär gelegene $\alpha 2$ -Untereinheit besitzt im Wesentlichen regulatorische Funktion und ist durch den $\alpha 2$ - δ -Komplex über Disulfidbrücken mit den $\alpha 1$ -Untereinheiten verbunden. Gleiches gilt für die β -Untereinheit welche intrazellulär liegt und über den β - γ -Komplex verbunden ist. Über die regulatorischen Einheiten kann die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle moduliert werden, sowie die Spannungsabhängigkeit beeinflusst werden. (eigene Abbildung adaptiert mit freundlicher Genehmigung an Gurkoff et.al)

Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wird durch die Interaktion der intrazellulären β -Untereinheit mit zahlreichen synaptischen Proteinen (Syntaxin, Synaptogamin), aber auch über die Phosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen beeinflusst (Gurkoff, Shahlaie et al. 2013). Entscheidend für das Verständnis der Beeinflussung der Kanäle ist dabei, dass ein Kanal mehrere offene und geschlossene Zustände besitzt. Es ist daher sinnvoller von einer Beeinflussung der Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals zu sprechen, als von einer direkten Öffnung (Buraei, Anghelescu et al. 2005). Die Pore für die Kalzium-Kationen, wird im Wesentlichen durch die vier $\alpha 1$ -Untereinheit gebildet (Abb.4B) (Reuter, Stock et al. 1996, Kamp, Hanggi et al. 2012). Die extrazelluläre $\alpha 2$ -Untereinheit besitzt, genau wie die β -Untereinheit regulatorische Eigenschaften. Hier kann über Phosphorylierungsprozesse oder direkte Ligandenbindung vor allem die Offenwahrscheinlichkeit und die Spannungsabhängigkeit der Kanäle moduliert werden. Der $\alpha 2$ - δ -Komplex verbindet die $\alpha 2$ -Untereinheit mit den vier $\alpha 1$ -Untereinheiten. Der β - γ -Komplex verbindet die β -Untereinheit mit den vier $\alpha 1$ -Untereinheiten (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

1.4.2 Relevanz der Kalziumkanäle in Bezug auf die spinale Muskelatrophie

Im Falle der spinalen Muskelatrophie konnte gezeigt werden, dass spontane Kalziumströme im Bereich der motorischen Endplatte herabgesetzt sind (Jablonka, Beck et al. 2007, Ruiz, Casanas et al. 2010). Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ist jedoch ein wichtiges Differenzierungssignal im Rahmen der Maturation von Motoneuronen. Der Anstieg führt unter anderem zu einer Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen und spielt eine Rolle bei der Regulation transkriptionaler Prozesse (Gu, Olson et al. 1994, Gu and Spitzer 1995). Während hingegen Muskelzellen von SMA-Mäusen in vitro normale elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen, konnte gezeigt werden, dass neben den gestörten spontanen Kalziumströmen auch die evozierte Freisetzung von Vesikeln im Bereich der aktiven

Zonen deutlich herabgesetzt ist (Ruiz, Casanas et al. 2010). Neben den veränderten spontanen Kalziumtransienten ist auch die Anordnung der Kalziumkanäle verändert. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Jablonka und Kollegen lässt sich postulieren, dass im Falle der spinalen Muskelatrophie das Clustering der Kalziumkanäle gestört ist und die Anzahl der Kalziumkanäle im Bereich der neuromuskulären Endplatte insgesamt reduziert ist. Dies führt konsekutiv zu der beobachteten Herabsetzung der spontanen Kalziumströme, sowie auch zu einer Störung der synaptischen Transmission aufgrund der gestörten evozierten Liberation von Vesikeln. Der Kalziumeinstrom in den Wachstumskegel, als Folge der Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und als Grundlage der Vesikelfreisetzung ist ein wichtiges Differenzierungssignal und über diesen Mechanismus verantwortlich für den Wachstumsstopp des Axons und die Differenzierung der neuromuskulären Endplatte. Ein adäquater, lokaler Anstieg des Kalziumlevels kann aber nur durch eine Zusammenlagerung von Kalziumkanälen erreicht werden (Cohan, Connor et al. 1987, Connor, Kater et al. 1990, Gu and Spitzer 1995). Man geht davon aus, dass es aufgrund der Störung dieser Mechanismen im Falle der spinalen Muskelatrophie zu einem Ausbleiben der neuronalen Differenzierung mit Störung der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte kommt. Es konnte gezeigt werden, dass der Aufbau der neuromuskulären Endplatte deutlich verändert ist. Insbesondere zeigt sich in Motoneuronen eines Mausmodells für spinale Muskelatrophie ein deutlich vermindertes Level an relevanten synaptischen Proteinen. Dies sind vor allem Synaptotagmin-1 und -2 (Syt-1/2) sowie das synaptic vesicle protein 2B (SV2B). Diese fungieren unter anderem als Kalziumsensoren, spielen aber auch bei der Andockung von Vesikeln im Bereich aktiver Zonen und der Endozytose eine Rolle. Eine Alteration bzw. ein knock-out dieser Proteine führt im Mausmodell zu einer schweren Störung der synaptischen Transmission (Tejero, Lopez-Manzaneda et al. 2016). Dies ist Ausdruck der gestörten Integrität des terminalen Axons aufgrund fehlender Differenzierungssignale. Aufgrund dieser Erkenntnisse hat man nach Substanzen gesucht, die in der Lage sind, gezielt die Offenwahrscheinlichkeit der N-Typ-Kalziumkanäle zu erhöhen, um so eine Differenzierung der Neurone durch einen vermehrten Kalziumeinstrom zu erzielen. Hierbei kamen verschiedene Substanzen zum Einsatz. Ein Agonist des N-Typ-Kalziumkanals ist R-Roscovitine, welches bisher im Wesentlichen als Therapeutikum im Rahmen der Therapie von Tumorerkrankungen untersucht wird.

1.4.3 R-Roscovitine

Eine Substanz für welche die agonistische Wirkung am $Ca_v2.2$ Kanal nachgewiesen werden konnte, ist die niedermolekulare Verbindung 2-(R/S) -(1-Ethyl-2-hydroxyethylamino) -6-benzylamino-9-isopropylpurine (Summenformel $C_{19}H_{26}N_6O$). Roscovitine (Selicilib®) hat ein Molekulargewicht von 354,46g/mol. Es besteht im Wesentlichen aus einer 2,6,9-trisubstituierten Purinbase, welche abhängig von der stereometrischen Ausrichtung einer Hydroxyethylamingruppe als R- oder S-Enantiomer vorliegt (Abb.5). Bezogen auf die Interaktion mit Kalziumkanälen wurde Roscovitine im Wesentlichen durch Untersuchungen der Gruppe um Buraei et al. charakterisiert (Buraei, Schofield et al. 2007, Buraei and Elmslie 2008).

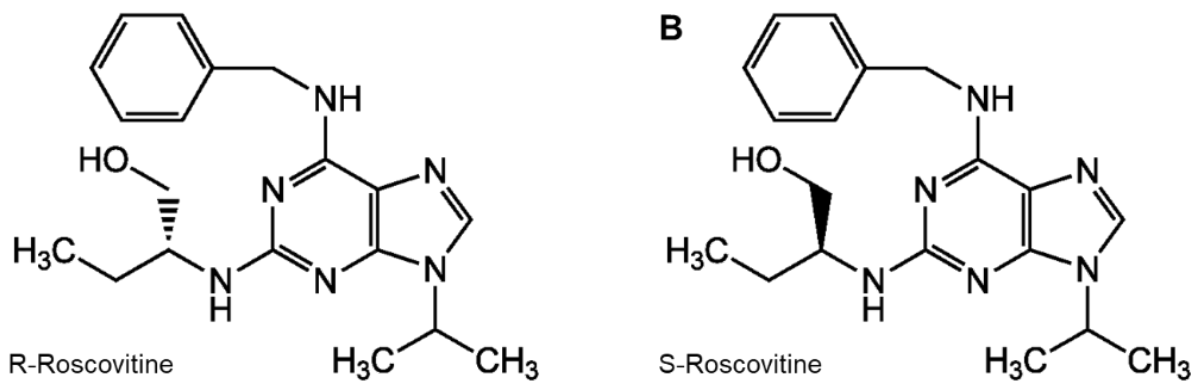


Abbildung 5: Strukturformel der Enantiomere R-Roscovitine und S-Roscovitine

Roscovitine besteht im Wesentlichen aus einer 2,6,9-trisubstituierten Purinbase, welche abhängig von der stereometrischen Ausrichtung einer Hydroxyethylamingruppe als R- oder S- Enantiomer vorliegt (mit freundlicher Genehmigung von Sigma Aldrich/Merck)

Molekulare Wirkmechanismen und therapeutischer Einsatz von Roscovitine

Die Substanz Roscovitine wurde ursprünglich als eine Nachfolgesubstanz des bekannten Kinase-Inhibitors Olomoucine entworfen. Das R-Enantiomer von Roscovitine charakterisiert sich durch eine hochselektive Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK). Dies gilt nahezu analog für das S-Enantiomer mit allerdings etwas höheren IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) Werten. Am potentesten und somit therapeutisch am Wichtigsten ist die Inhibition der CDKs2 und 5. Wobei auch eine Beeinflussung von CDK1, 7 und 9 beschrieben ist. Die Modulation von CDK4 und 6 scheint keine Rolle zu spielen (Meijer, Slotman et al. 1997, Bach, Knockaert et al. 2005, Cicenas, Kalyan et al. 2015). Cyclin-abhängige Kinasen spielen bei der Regulation des Zellzyklus und somit bei der Proliferation und Differenzierung

von Zellen eine entscheidende Rolle. Dies begründet den Einsatz von CDK-Inhibitoren in der Tumorthherapie. Vor allem R-Roscovitine wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten erprobt, hierzu zählen vor allem gynäkologische Malignome, das hepatozelluläre Karzinom, Lymphome, Prostatakarzinome, kolorektale Malignome und zahlreiche Weitere (Cicenas, Kalyan et al. 2015).

Im Gegensatz zu Olomoucine wurde für R-Roscovitine jedoch ein weiterer Mechanismus der Einflussnahme auf Zellen beschrieben. R-Roscovitine verlangsamt die Deaktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Dies gilt sowohl für Kanäle des P/Q-Typs, als auch des N-Typs. Durch die verzögerte Deaktivierung erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und in Summe kann somit mehr Kalzium über die Membran strömen (Yan, Chi et al. 2002, Buraei, Anghelescu et al. 2005, Buraei, Schofield et al. 2007, Buraei and Yang 2010). Die Tatsache, dass die Modulation der Kalziumkanäle nur relevant wird, wenn R-Roscovitine von extern und nicht direkt in die Zelle appliziert wird, legt nahe, dass der zugrundeliegende Wirkmechanismus unabhängig von der Beeinflussung der CDKs ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in den hier eingesetzten Konzentrationen nur das R-Enantiomer, nicht aber das S-Enantiomer der Substanz Roscovitine relevanten Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kalziumkanäle hat. S-Roscovitine bindet zwar in sehr hohen Konzentrationen auch an den Kalziumkanal, vergleicht man aber die EC_{50} (mittlere effektive Dosis) der beiden Substanzen für die Modulation der Kalziumkanäle, so liegt die von S-Roscovitine mit $565\mu\text{M}$ gut 20fach oberhalb der EC_{50} von R-Roscovitine ($28\mu\text{M}$) (Buraei and Elmslie 2008, Fan, Buraei et al. 2010, Buraei, Lee et al. 2015). Somit unterscheiden sich die beiden Substanzen durch die Wahl der eingesetzten Konzentration, bezüglich ihrer agonistischen Wirkung am spannungsabhängigen P/Q-Typ und N-Typ Kalziumkanal. Der antizipierte, positive Effekt von R-Roscovitine auf die Kalziumhomöostase und somit die Möglichkeit des Einsatzes von R-Roscovitine als Therapeutikum für Erkrankungen mit gestörter synaptischer Transmission, führte zur Entwicklung von Substanzen, welche agonistische Wirkung an Ca_v -Kanälen aufweisen ohne die CDKs zu beeinflussen. Erste Versuche mit der als GV-58 bezeichneten Substanz an in vitro-Modellen für das Lambert-Eaton-Syndrom konnten eine Verbesserung der synaptischen Transmission und konsekutiv auch des Zellüberlebens zeigen (Pevarello, Cainarca et al. 2014).

2. Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten dargelegt, ist ein wesentlicher Bestandteil der Krankheitstheorie der spinalen Muskelatrophie ein verminderter Kalziumeinstrom an der neuromuskulären Endplatte. Dies führt zu einem Ausbleiben von Differenzierungs- und Überlebenssignalen. Diese Theorie wird gestützt durch Untersuchungen an isolierten Motoneuronen von transgenen Mäusen, welche ein vermindertes Clustering von Kalziumkanälen, sowie resultierend verminderte spontane Kalziumströme aufweisen (Jablonka and Sendtner 2003, Rossoll, Jablonka et al. 2003, Jablonka, Beck et al. 2007, Rak, Lechner et al. 2009). Aus Untersuchungen, die bereits Ende der 90er Jahre durchgeführt wurden, weiß man heute, dass insbesondere N-Typ- $Ca_v2.2$ -Kalziumkanäle im Rahmen der Zellmaturation eine Rolle spielen (Westenbroek, Hoskins et al. 1998).

In Kenntnis dieser Pathophysiologie ist die Zielsetzung dieser Arbeit, den Einfluss der Substanz R-Roscovitine als Agonist am $Ca_v2.2$ -Kanal im Hinblick auf die *in vitro* Differenzierung und das Wachstumsverhalten von kultivierten murinen Motoneuronen, sowie das Überleben der Tiere *in vivo* zu untersuchen. Im Wesentlichen sollen folgende Fragestellungen adressiert werden:

1. Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine zu einer Restitutio des axonalen Wachstums in der Zellkultur?
2. Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten zu einer Restitutio der Größe und Organisation des Wachstumskegels (präsynaptischer Bereich)?
3. Lässt sich durch die pränatale Applikation von R-Roscovitine in ein trächtiges Muttertier eine nutzbringende Wirkung bei Smn-defizienten Nachkommen erzielen?
4. Ist der positive Effekt von R-Roscovitine isoliert durch einen Agonismus am spannungsabhängigen Kalziumkanal bedingt oder spielt die Modulation der Cyclin dependent kinase 5 (CDK5) ebenfalls eine Rolle?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Mauslinien

Smn^{-/-}; SMN2 Mauslinie Jackson Laboratories

Smn^{-/-}; SMN2; SMNΔ7 Mauslinie Jackson Laboratories

3.1.2 technische Geräte

Binokulares Operationsmikroskop	Leica MZ75
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer (Agarose)	PeqLab
Elektrophoresekammer (SDS)	Bio-Rad
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	(Curix 60) AGFA Inkubator
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Konfokale Mikroskope	Leica TCS 4D
	Leica TCS single photon 2 (SP2)
PCR-Cycler	Mastercycler, Eppendorf AG
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf AG
pH-Meter (pH211)	Hanna Instruments
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
Präzisionswaage EW 2200	Kern und Sohn GmbH
Präzisionswaage SAE 200	Bosch
Schüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf AG
	Thermocycler Mastercycler
	Eppendorf
	Vortex Mixer GLW L46 Hartenstein
Ultraschall Wasserbad	Bandelin
UV-Transluminator für Agarosegel	Intas
Wasserbad	Memmert
Western-Blot Transfersystem	Bio-Rad
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Eppendorf AG
	miniSpin, Eppendorf AG

BiofugeR fresco/ Heraeus
Instruments

3.1.3 eingesetzte Software

GraphPad Prism 5.0	San Diego, CA
GraphPad Prism 7.0	San Diego, CA
ImageJ	WS Rasband, US
Leica LAS-AF lite	Leica
Office 2016/2018 Excel, Power Point, Word	Microsoft

3.1.4 allgemeine Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Roth
<i>Blotting</i> -Papier	Bio-Rad
Deckgläschen	Hartenstein
Glaspipetten (10 ml; 5 ml)	Hartenstein
Objektträger (76x26 mm)	R. Langenbrinck
Parafilm	Sarstedt
Pipettenspitzen (1000µl; 200µl; 10µl)	Sarstedt
Präparationsbesteck	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

3.1.5 eingesetzte Chemikalien

Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Thermo Fisher Scientific
<i>Aqua bidestillata</i> (Aqua bidest.)	DeltaSelect
B-27-Supplement (50x)	Thermo Fisher Scientific
Betaine (5 M)	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich

<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF)	Chemicon Europe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Chelex	Biorad
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck
<i>Ciliary neurotrophic factor</i> (CNTF)	Institut für klinische Neurobiologie, Universität Würzburg
Conotoxin (CTX)	Biotrend
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (dNTPs 10mM)	MBI Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
DNA-Marker (100bp)	Fermentas
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glucose	Merck
GlutaMAX™-I (500 µM)	Thermo Fisher Scientific
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
<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 ₂)	Merck
Laminin-111 (<i>Purified human Laminin</i>)	Thermo Fisher Scientific
Laminin-221/211 (<i>Purified human Merosin</i>)	EMD Millipore
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mowiol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck
Neurobasal (NB)	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Thermo Fisher Scientific
Polyacrylamid (40%)	Biorad
Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid (Polyornithin)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylene-sorbitane-monolaurate	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
TritonX-100 (0,3%)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Worthington
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich
<i>Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare

4.1.6 Medien und Pufferlösungen

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
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.

Ladepuffer (6x)	Glycerin (30%), Xylencyanol (0,25%), Bromphenolblau (0,25%), TAE (1x) 32
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)
PFA-Lösung (4%)	40 g PFA, 410 ml Na ₂ HPO ₄ /2H ₂ O, 90 ml NaH ₂ PO ₄ /2H ₂ O, 500 ml Aqua bidest.
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 33

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

3.1.7 Antikörper, Enzyme und Primer

Primärantikörper	Verdünnung	Klonalität	Herkunft	Firma
beta-Aktin (IZ)	1:500	Monoklonal	Maus	GeneTex
F-Aktin (WB)	1:1000	Monoklonal	Maus	GeneTex
CDK 5 (WB)	1:500	Monoklonal	Maus	Thermo-Fisher Scientific Sigma-Aldrich
GAPDH (WB)	1:500	Monoklonal	Maus	GeneTex
GAPDH (WB)	1:5000	Polyklonal	Kaninchen	GeneTex
N-Typ-Cav2.2 Kanal α 1b-Untereinheit (IZ)	1:200	Polyclonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Tau (IZ)	1:1000	Polyclonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Eingesetzte Primärantikörper (WB: Western blot, IZ: Immunzytochemie; GAPDH: Glycerinaldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase; CDK5: Cyclin dependent kinase 5)

Sekundärantikörper	Verdünnung	Spezifität	Firma
Cy2	1:200	Anti-Maus	Dianova
Cy2	1:400	Anti-Kaninchen	Jackson Immuno-research
Cy3	1:300	Anti-Maus	Dianova
Cy3	1:600	Anti-Kaninchen	Jackson Immuno-research
Cy5	1:500	Anti-Kaninchen	Dianova

Tabelle 3: Eingesetzte Sekundärantikörper

Enzyme	Firma
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	5'Prime
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche

Tabelle 4: Eingesetzte Enzyme (Taq: *Thermophilus aquaticus*)

Primer	Sequenz
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'

Tabelle 5: Eingesetzte Primer: eingesetzte Primer zur Genotypisierung (SMN: survival motoneuron)

3.2 Zellkultur und Tiermodelle

3.2.1 Tierhaltung und Mauslinie

Für die Haltung der Tiere in der zentralen Tierzuchteinrichtung des Institutes für klinische Neurobiologie liegt eine Genehmigung des Veterinäramtes der Stadt Würzburg, sowie der Ethikkommission für Tierversuche der Regierung von Unterfranken vor (Antragsnummern: 55.2-2531.01-11/09 und 55.2-2531.01-33/14). Die Haltungsbedingungen sind analog zu den Vorgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und der „Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International“ (AAALAC). Dies umfasst eine kontrollierte Wasser- und Nahrungszufuhr, konstante Temperaturen von 20-22°C, eine festgelegte Luftfeuchtigkeit von 55-65%, sowie einen Hell/Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden. Die Mitarbeiter der Tierzuchteinrichtung sind entsprechend geschult und die Versuchsleiterin Frau PD. Dr. Jablonka besitzt die Berechtigung zur Durchführung der Versuche.

Die verwendete Mauslinie zur Untersuchung primärer SMA Motoneurone besitzt einen FVB/NJ-Modell Hintergrund. Für die hier durchgeführten primären Motoneuronkulturen wurden analog zu der Beschreibung von Monani et al. embryonale Zellen aus dem transgenen *Smn*^{-/-}; *SMN2* Mausmodell verwendet (Monani et al., 2000). Die in vivo Experimente wurden im *Smn*^{-/-}; *SMN2*; *SMNΔ7* Mausmodell durchgeführt (Le et al., 2005; Grundlagen siehe 1.2.7 Tiermodelle).

3.2.2 Kultivierung primärer Motoneurone

Die gesamte Kultivierung, sowie auch die Präparation der primären Motoneuronen wurden analog der Beschreibung von Wiese und Kollegen durchgeführt (Wiese, Herrmann et al. 2010). Konkret beinhaltet dieser Vorgang die Präparation der Embryonen an Embryonal-Tag 13,5, die Isolation, sowie Anreicherung und Kultivierung der Motoneurone.

Präparation

Die Euthanasie der Tiere, sowie Präparation erfolgte außerhalb der Tierzuchteinheit in einer Tieroperationseinheit. Die trächtigen Muttertiere wurden am Embryonal-Tag 13,5 euthanisiert. Dies geschah kontrolliert nach Narkotisierung der Tiere durch eine zervikale Dislokation. Im Anschluss erfolgte die Präparation des gesamten Uterus.

Sodann erfolgte die Präparation der einzelnen Embryonen aus dem Uterusschlauch. Von den freipräparierten Embryonen wurden der Kopf und der Schwanz abgetrennt, in Aqua bidest. gewaschen und in 200µL Lysispuffer eingelegt.

Im Anschluss erfolgte die Präparation des Rückenmarkes in Bauchlage unter dem Operationsmikroskop. Entnommen wurde das lumbale Rückenmark ohne Dura mater und ohne anhängende Hinterwurzelganglien. Bis zum Abschluss der Präparation wurden die Eppendorf Röhrchen auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Gewebe mit 0,025%igem Trypsin in HBSS für 10min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Denaturierung durch Zugabe von 0,1%igem Trypsininhibitor gestoppt. Das partiell denaturierte Gewebe wurde mittels einer Pipette mehrfach trituriert, sodass eine Einzelzellsuspension entstand.

Anreicherung

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Grundlage der Anreicherung der primären Motoneurone ist die Tatsache, dass sich zu dem gewählten Entwicklungszeitraum auf der Oberfläche von Motoneuronen ein niedrigaffiner Rezeptor für Neurotrophine befindet, der p75NTR Rezeptor (Wiese 1998).

Um diesen zu binden wurden Zellkulturschalen mit einem p75NTR Antikörper beschichtet. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend bei Raumtemperatur für 30 min unter der Sterilbank inkubiert.

Die einzelnen Wells wurden im Anschluss dreimal mit Neurobasallösung gewaschen, um die nicht gebundenen Zellen aus dem Ansatz zu entfernen. Durch Zugabe einer Depolarisationslösung wurde die Bindung zwischen Antikörper und Rezeptor anschließend wieder gelöst.

Kultivierung der primären Motoneurone

Die Kultivierung der Motoneurone erfolgte auf Laminin-221/211. Die primären Motoneurone für Western blot Analysen wurden direkt auf dem Boden der

Kulturschalen kultiviert, während hingegen die Kultivierung für die Immunfluoreszenzmikroskopie auf Deckgläschen erfolgte. Prinzipiell ist dieser Vorgang aber identisch.

Zuerst wurden die Deckgläschen bzw. Zellkulturschalen mit 5mg/ml Poly-D/L-Ornithine Hydromid (PORN H) beschichtet. Das PORN H wurde in Boratpuffer gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur unter der Sterilbank für insgesamt 60min auf den Deckgläschen bzw. Zellkulturschalen belassen. Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Waschung mit Aqua bidest.. Im Anschluss wurde die Laminin-221/211 (2,5µg/ml gelöst in HBSS) aufgetragen und für 30min belassen.

Die angereicherten Motoneurone wurden in Motoneuronmedium überführt und für insgesamt 5 Minuten bei 400g ohne abbremesen zentrifugiert. Dies ermöglicht das Auszählen der Neurone in einer Neubauer Zählkammer. Für die Ansätze zur Immunfluoreszenzmikroskopie wurden nach Absaugen der Lamininlösung 2000-3000 Zellen pro cm² auf dem Deckgläschen ausgesät. Im Falle der Ansätze zur Western blot Analyse wurden pro Well mindestens 5000 (max. 10000) Zellen pro cm² ausgesät.

Für die Längenanalysen wurden die Neurone für 7 Tage (DIV 7) kultiviert. Für die Analyse der Wachstumskegel und die Western blot Analysen jeweils 5 Tage (DIV 5). Die Kultivierung erfolgte in Motoneuronmedium bei 37,0°C und 5% CO₂. Die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF wurden jeweils in einer Konzentration von 10ng/ml in das Motoneuronmedium gegeben. Je nach Ansatz erfolgte die Zugabe von CTX, R/S-Roscovitine oder beiden Substanzen. Alle 2 Tage wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt.

3.2.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden die bei der Präparation entnommenen Kopf- und Schwanzstücke der Embryonen verwendet. Zu jedem der Ansätze mit 200µL Lysispuffer wurden 10µL Proteinase K gegeben. Im Anschluss wurden die Eppendorf Röhren bei 55°C im Schüttler für mindestens 30min inkubiert. Um den enzymatischen Verdau zu terminieren, wurden die Ansätze für 8min bei 100°C aufgeköcht und anschließend für 5min bei 13000 bis 14000rpm (je nach Gerätetyp) zentrifugiert. Der flüssige Überstand mit der enthaltenen DNA wurde abpipettiert. Mithilfe des Nano Drop Spektrometers erfolgte die Bestimmung des DNA-Gehaltes in

der flüssigen Phase. Anhand dieser Ergebnisse erfolgte gegebenenfalls eine Verdünnung auf eine Endkonzentration von 150ng/µL.

Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Um den Genotyp der Embryonen zu bestimmen wurden pro Embryo jeweils eine Kontroll-PCR (*Smn*^{+/+}; *SMN2*), sowie eine „Mutanten“-PCR (*Smn*^{-/-}; *SMN2*). Gemeinsam ist beiden die Zugabe des sense primer (SMN 201f; siehe Tabelle 5). Der Unterschied liegt in den zugesetzten antisense Primern. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100nmol/µL eingesetzt, dies entspricht einer Endkonzentration von 0,3nmol/µL.

Zusätzlich wurden den PCR Ansätzen 10-facher PCR Puffer (Verhältnis 1:10) und 10mM dNTPs (Verhältnis 1:50) zugesetzt. Dem *Smn*^{+/+}; *SMN2* Ansatz wurde zusätzlich noch 5M Betain hinzugefügt. Die DNA wurde dann beiden Ansätzen in einem Verhältnis von 1:50 zugesetzt. Direkt vor Beginn der PCR wurde dann die Taq-DNA-Polymerase (5U/µL) hinzugegeben und der gesamte Ansatz mit dem Vortex gemischt.

Der PCR Ansatz sah somit im Detail wie folgt aus:

Substanz	Menge
DNA (150ng/µL)	1,5 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
SMN 201f Primer (100nmol/µL)	0,15 µL
Kontrolle/Mutante Primer (100nmol/µL)	0,15 µL
10fach Puffer	5 µL
<i>Smn</i> ^{+/+} ; <i>SMN2</i> PCR: Betain (5M)	10µL
HPLC-H ₂ O	Ad 50 µL

Tabelle 6: PCR Ansatz: Betain wurde nur im Falle der PCR für die *Smn*^{+/+}; *SMN2* Kontrolltiere eingesetzt. (DNA: Desoxyribonukleinsäure; dNTPs: Deoxynukleosidtriphosphate; SMN: survival motoneuron)

Der erste PCR Zyklus hat eine konstante Temperatur von 94°C für 3 Minuten und dient der Denaturierung der Doppelstrang DNA in Einzelstränge. Der zweite Zyklus beginnt mit einer Abkühlungsphase auf 57° C. Diese Temperatur wird für 45 sec gehalten. In diesem Zeitraum kommt es zum Annealing, d.h. zur Bindung der Primer an die korrespondierenden Sequenzen. Anschließend erfolgte die Elongation bei 72°C für insgesamt 90 sec. Dieser Zyklus wurde insgesamt 30mal wiederholt. Für die

Elektrophorese wurde den einzelnen Ansätzen anschließend farbiger Ladepuffer hinzugefügt.

Gelelektrophorese

Die Elektrophorese dient der Auftrennung der zuvor amplifizierten DNA-Abschnitte. Grundlage der Unterscheidung ist die unterschiedliche Länge des WT Abschnittes im Vergleich zur Mutante. Der intakte wildtypische Abschnitt stellt sich hierbei bei einer Länge von 879bp dar, während hingegen der „Mutanten“-Abschnitt bei 600bp zur Darstellung kommt.

Als Trägermaterial der Gelelektrophorese diente in diesem Fall ein Agarosegel. Hierfür wurden durch Erhitzen 1,5g Agarose in 100ml 1fach TAE gelöst und 5µL Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach dem Erkalten des Gels, wurde dieses in der Elektrophorese Kammer platziert. Diese wurde dann mit 1fach TAE Puffer gefüllt. Anschließend erfolgte die Beladung der Taschen. Tasche 1 wurde immer mit dem Marker beladen. In den restlichen Taschen folgten die DNA-Proben. Daraufhin wurde ein Gleichstrom von 100V für mindestens 30min an die Kammer angelegt. Mithilfe des farbigen Laufpuffers konnte die Auftrennung verfolgt werden. Die Auftrennung des eingefärbten Markers diente ebenfalls als Erfolgskontrolle der korrekten Auftrennung. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die einzelnen Banden unter UV-Licht dargestellt und ausgewertet. Im Falle homozygoter WT Allele zeigte sich ausschließlich eine Bande bei 879bp und im Falle der homozygoten Mutanten ausschließlich eine Bande bei 600bp. Bei heterozygoten Tieren zeigte sich sowohl eine Bande in der WT als auch in der Mutanten PCR.

3.3 Immunzytochemie und Western Blot

3.3.1 Immunzytochemie und Mikroskopie

Nach Kultivierung der Motoneurone für 5 bzw. 7 Tage erfolgte zunächst die Fixierung der Motoneurone auf den Deckgläschen für die Immunfluoreszenzmikroskopie. Hierfür wurde das Nährmedium abgesaugt und 4%PFA in PBS zur Fixierung der Zellen aufgebracht. Nach Belassen des PFAs für insgesamt 30min, folgte eine dreimalige Waschung mit je 1,5ml TBS-T. Im Anschluss wurden die Zellen 5 Minuten mit -20°C

kaltem, 100%igem Aceton behandelt. Die Plättchen wurden dann in neue Behältnisse überführt und erneut dreimal mit je 1,5ml TBS-T gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für insgesamt 30min mit einer Blocking-Lösung auf Basis von 10% BSA behandelt. Dies dient der Sättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2), gelöst in 1% BSA in 1fach TBS-T. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Als nächster Schritt wurden die Zellen erneut dreimal mit je 1,5ml TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für insgesamt 30min erneut mit der Blocking Lösung auf Basis von 10% BSA behandelt. Daraufhin erfolgte unter Abschirmung von Licht eine 30-minütige Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3), welcher ebenfalls in 1% BSA in 1fach TBS-T gelöst wurde. Anschließend erneute dreimalige Waschung. Abschließend wurden die Plättchen unter Lichtabschluss in Mowiol eingebettet und ggf. bis zur Mikroskopie bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

Mikroskopie

Die Auswertung der Zellen erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie unter den Mikroskopen der Firma Leica (vor allem Leica TCS SP2). Zur Einschätzung der Zellvitalität bzw. Entwicklungszustandes eines Motoneurons wurde die Ausbildung von Dendriten und des Wachstumskegels herangezogen. Dies dient insbesondere der Abgrenzung gegenüber Gliazellen.

Die Längenauswertung erfolgte mit der LAS AF Lite Software. Für die Analyse der Areale der Wachstumskegel und Intensitäten von β -Aktin und der Cav2.2 N-Typ-Kalziumkanäle wurden die Einstellungen der Laserstärke, Blendenöffnung und Position des Präparates für jede Messung gleich gewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.3.2 Western blot Analysen

Für den Western blot wurden die primären Motoneurone genutzt, welche 5 Tage am Boden der Wells, d.h. ohne Deckplättchen, kultiviert wurden. An Tag 5 erfolgten nach Entfernung des Mediums zunächst drei Waschvorgänge mit PBS. Im Anschluss wurden die etwa 30000 bis 50000 Motoneurone pro Ansatz mit 2fach Lämmli-puffer

lysiert und mit einem Schaber vom Boden gelöst. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Eppendorf tubes überführt und für 5min auf 99°C erwärmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden die Zellen auf ein 1mm dickes Polyacrylamidgel geladen. Das Gel besteht aus einem 5%igem Sammelgel, sowie einem 10%igem Trenngel. Sinn des Sammelgels ist, dass alle Bestandteile gemeinsam in das Trenngel einlaufen. Für das Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Stromstärke von 20mA gewählt, für das Trenngel 27mA. Ein zusätzlich aufgetragener Marker diente als Referenz und Erfolgskontrolle.

Western-Blot (Semi-dry)

Um eine Antikörperfärbung der aufgetrennten Proteine durchzuführen, müssen diese auf eine PVDF Membran übertragen werden. Hierfür wurde Blotting-Papier in Transferpuffer getränkt und auf die untere Blot-Elektrode gelegt. Hierauf wurde, die zuvor mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer gewaschene, PVDF-Membran platziert. Im Anschluss wurde ausschließlich das Trenngel aus der Elektrophorese Kammer entnommen. Das Trenngel wurde auf der PVDF-Membran platziert. Zu Oberst wurde Blotting-Papier platziert, welches erneut in Transferpuffer getränkt wurde.

Anschließend wurde Luftblasen durch Auswalzen entfernt. Dann wurde die zweite Elektrode durch das Schließen des Deckels platziert und der Blot Vorgang mit einer Laufzeit von 3 Stunden gestartet (5 Volt, 3 Amper und 300 Watt).

Antikörperinkubation und Auswertung

Nach Beendigung des Blot Vorganges wurde die PVDF Membran entnommen. Anhand der Darstellung des Markers wurde bereits eine erste Qualitätseinschätzung vorgenommen. Die Membran wurde im Anschluss für 60 Minuten in 5%iger Milchlösung (TBS-T als Lösungsmittel) auf dem Kipptisch gewaschen. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Antikörper (CDK 5, GAPDH, F-Aktin (vgl. Tabelle 2)) in Milchpulverlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit 1fach TBS-T gewaschen. Auch der Sekundärantikörper wurde in Milchpulverlösung gelöst. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Vor der Entwicklung auf Röntgenfilmen wurde die Membran mit ECL Lösung

unter Lichtausschluss behandelt. So kamen die einzelnen Banden als Chemielumineszenz-Signale nach Durchlaufen der Entwicklermaschine auf dem Röntgenfilme zur Darstellung. Die Auswertung der Filme erfolgte mit der Software Image J.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der in Image J oder LAS AF Lite generierten Werte erfolgte mit der GraphPad Prism Software (Versionen 5 und 7). Die Auswertungen wurden jeweils als Säulendiagramm dargestellt. Diese spiegeln jeweils den Mittelwert wider. Oberhalb der eigentlichen Säule findet sich die Angabe der Standardabweichung des Mittelwertes. In den meisten Fällen handelte es sich um Normalverteilte Werte. Hier wurde der one-way Anova mit Turkey Post-hoc Analyse verwendet. Bei nicht-normal verteilten Werten der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Post-Hoc Test. Die Signifikanzen wurden in den einzelnen Grafiken als Sternchen angegeben (* $p = 0,05$; ** $p = 0,01$; *** $p = 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1 *R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des axonalen Längenwachstums in der Motoneuronkultur auf Laminin-221*

In der Annahme, dass dem gestörten Längenwachstum der Axone in den Motoneuronkulturen fehlende Überlebens- bzw. Differenzierungssignale aufgrund eines alterierten Kalziumstromes zu Grunde liegen, wurden Untersuchungen des Einsatzes des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine an kultivierten Motoneuronen durchgeführt. Die Motoneurone wurden nach Präparation des Rückenmarkes 13,5 Tage alter muriner Embryonen isoliert und anschließend insgesamt sieben Tage auf Laminin-221 kultiviert. Zu allen Ansätzen wurden die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF hinzugegeben. Im Vorfeld erfolgte eine Genotypisierung der Zellen mittels der beschriebenen PCR-Methode. Es wurden insgesamt acht Bedingungen miteinander verglichen um eine valide Aussage bezüglich des Wachstumsverhaltens von Motoneuronen auf Laminin-221 unter Zusatz von R-Roscovitine zu ermöglichen. Es wurden jeweils drei unabhängige Kulturen des Wurfes dreier Muttertiere pro Ansatz untersucht.

Für beide Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 wurde jeweils ein Ansatz nur mit Zusatz von BDNF und CNTF, ein Ansatz mit Zusatz von BDNF, CNTF und 0,3µM ω-Conotoxin, ein Ansatz BDNF, CNTF und 0,5µM R-Roscovitine und ein Ansatz mit BDNF, CNTF, 0,5µM R-Roscovitine plus 0,3µM ω-Conotoxin analysiert. Die Konzentration von R-Roscovitine wurde bereits vor dieser Arbeit in Überlebensanalysen von kultivierten Motoneuronen durch die Arbeitsgruppe Jablonka etabliert. Die Zugabe des hochaffinen ω-Conotoxin führt zu einer spezifischen Blockade der N-Typ-Kalziumkanäle und dient in diesem Ansatz als Negativkontrolle. Beim Vergleich der *Smn*^{+/+}; SMN2- und *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, die ausschließlich mit BDNF und CNTF kultiviert wurden, zeigte sich, dass die *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, im Vergleich zu denen der *Smn*^{+/+}; SMN2 *Kontrolltiere*, unter diesen Bedingungen signifikant länger auswachsen (Abb. 6 und Abb.7 A und B).

Die Zugabe von ω-Conotoxin zu sowohl den *Smn*^{+/+}; SMN2-Motoneuronen als auch zu den *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneuronen bewirkte ein signifikant längeres Auswachsen der *Smn*^{+/+}; SMN2 Motoneurone im Vergleich zu den unbehandelten *Smn*^{+/+}; SMN2 Motoneuronen ohne ω-Conotoxin, während hingegen die Zugabe des Toxins keinen

signifikanten Einfluss auf das Auswachsen der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone hatte (Abb. 6 und Abb. 7 C und D).

Im Gegensatz zur Zugabe von ω -Conotoxin, zeigte die Zugabe von R-Roscovitine zum Kulturmedium keinen Einfluss auf das Längenwachstum der *Smn*^{+/+}; SMN2-Motoneurone, was bereits aus den vorherigen Untersuchungen bekannt war. Im Falle der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone bewirkte die Zugabe von R-Roscovitine jedoch eine Normalisierung des Längenwachstums auf das Niveau der Kontrolltiere. Die mit BDNF, CNTF und R-Roscovitine kultivierten Motoneurone *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 zeigten somit keinen signifikanten Unterschied mehr im Längenwachstum, während hingegen der Unterschied zwischen den Gruppen *Smn*^{+/+}; SMN2 plus BDNF und CNTF versus *Smn*^{-/-}; SMN2 plus BDNF, CNTF und Roscovitine signifikant war (Abb. 6 und Abb. 7 B,E und F). Die Zugabe von ω -Conotoxin führte in beiden Gruppen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 auch in Gegenwart von Roscovitine zu einem signifikant längeren Auswachsen im Vergleich zu den Ansätzen mit BDNF, CNTF und R-Roscovitine (Abb. 6 und Abb. 7 G und H).

Zusammenfassend lässt sich aus diesem Versuchsaufbau festhalten, dass die kultivierten Motoneurone des Genotyps *Smn*^{-/-}; SMN2, als Modell für die spinale Muskelatrophie, in Gegenwart von R-Roscovitine zu ein normales axonales Längenwachstum auf Laminin-221 zeigen. Dies bedeutet, dass sich das Längenwachstum der zuvor aufgrund eines fehlenden Differenzierungssignal signifikant länger auswachsenden *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, auf das Niveau der Kontrolltiere reduziert. Roscovitine ist somit in vitro in der Lage den Längenphänotyp auf Laminin-221 der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, im Sinne einer vollständigen restitutio, zu normalisieren. Die Zugabe des hochaffinen N-Typ-Kalziumkanal-Inhibitors ω -Conotoxin führt hingegen in allen Ansätzen zu einem deutlich alterierten Längenwachstum. Dies ist Ausdruck der nicht mehr adäquaten Differenzierung der Neurone auf Laminin-221 durch das Ausbleiben adäquater Kalziumströme. Wie erwartet, ist die Affinität von ω -Conotoxin bezogen auf die Modulation der N-Typ-Kalziumkanäle höher als die von R-Roscovitine.

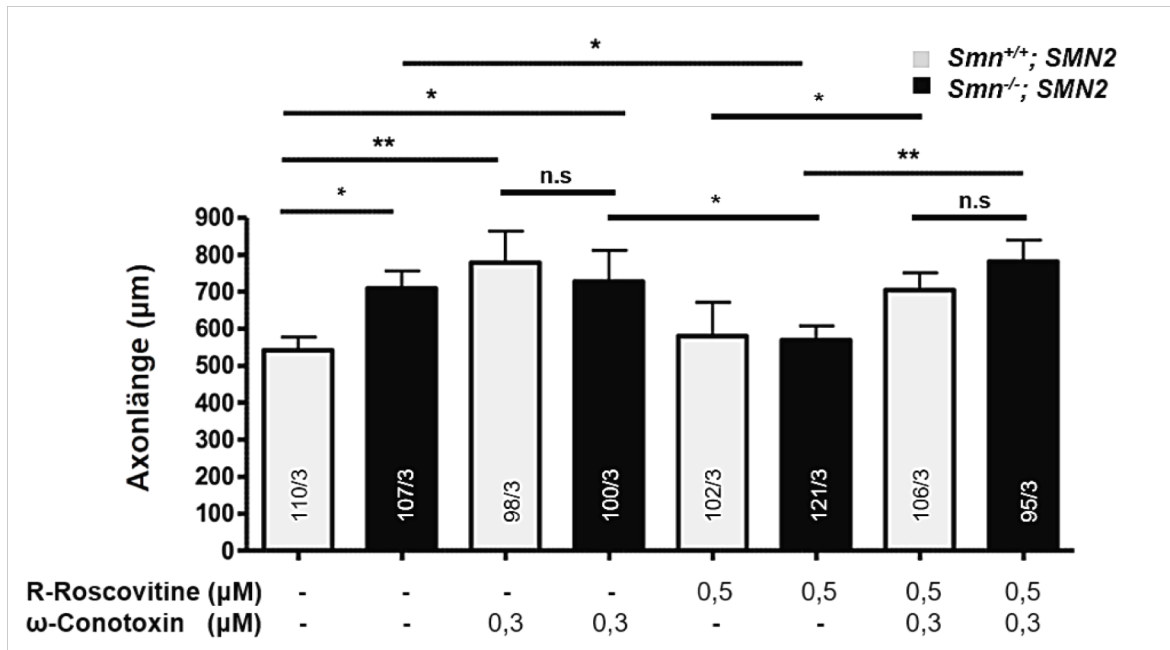


Abbildung 6: R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des axonalen Längenwachstums in der Motoneuronkultur auf Laminin-221.

Dargestellt ist das Längenwachstum 7 Tage *in vitro* auf Laminin-221 kultivierter muriner Motoneurone. Auf der Ordinatenachse ist die Axonlänge in µm aufgetragen. Auf der Abszissenachse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen das Strukturprotein Tau. Je nach Ansatz wurden dann entsprechend 0,3µM ω-Conotoxin oder 0,5µM R-Roscovitine oder beide Substanzen zugesetzt. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen. Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der Experimente). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: Smn^{+/+}; SMN2; schwarz: Smn^{-/-}; SMN). Es zeigt sich der bekannte signifikante Längenunterschied der beiden Genotypen unter den Bedingungen mit nur BDNF und CNTF mit deutlich längeren Axonen der Smn^{-/-}; SMN2 Motoneurone (Signifikanzniveau: *). Die Behandlung mit 0,5µM R-Roscovitine führt zu einer Restitutio des Längenwachstums auf Laminin-221, so dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Kontroll-Motoneuronen Smn^{+/+}; SMN2 und den Smn^{-/-}; SMN2 (Signifikanz der Gruppen mit nur 0,5µM R-Roscovitine: nicht signifikant), während hingegen ein signifikanter Unterschied zwischen den Smn^{-/-}; SMN2 Zellen ohne Zusatz und mit Zusatz von 0,5µM R-Roscovitine vorlag (Signifikanzniveau: *).

Die Zugabe von ausschließlich 0,3µM ω-Conotoxin führte zu einem signifikant längeren Auswachsen der Axone der Smn^{+/+}; SMN2-Motoneurone im Vergleich zu den Zellen ohne weitere Zusätze oder mit nur 0,5µM R-Roscovitine (Signifikanzniveau: *). Auf das Auswachsen der Axone der Smn^{-/-}; SMN2 Motoneurone hatte die Zugabe von 0,3µM ω-Conotoxin, verglichen mit den Zellen, zu denen keine weiteren Substanzen hinzugegeben wurden, keinen Einfluss. In dieser Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Smn^{+/+}; SMN2- und den Smn^{-/-}; SMN2 Motoneuronen. In dem Ansatz mit sowohl Zugabe von 0,3µM ω-Conotoxin als auch 0,5µM R-Roscovitine führte zu einem Auswachsen der Axone, welches der Situation mit nur Zugabe von 0,3µM ω-Conotoxin entsprach. Der positive Effekt der Zugabe von 0,5µM R-Roscovitine konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass R-Roscovitine in der Lage ist den Elongationsdefekt von Axonen der Smn^{-/-}; SMN2 Motoneuron zu normalisieren. In Gegenwart von ω-Conotoxin, einem hochselektiven Antagonisten der spannungsabhängigen Kalziumkanäle konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr beobachtet werden, im Gegenteil es zeigte sich, dass auch die Axone der Kontrolltiere pathologisch lang auswachsen. (Abkürzungen: n.s.: nicht signifikant, *: p-Wert <0,05; **: p-Wert <0,01; -: nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

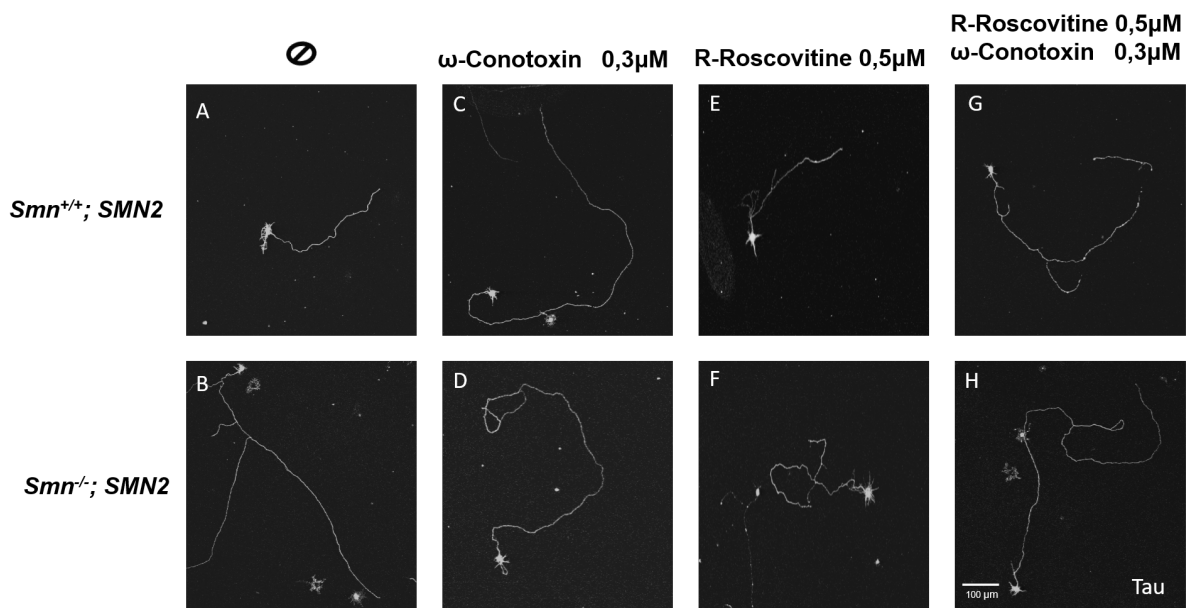


Abbildung 7: Exemplarische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Motoneuronen auf Laminin-221 nach Kultivierung mit ω -Conotoxin und R-Roscovitine

Entsprechend der in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse sind exemplarische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $Smn^{+/+}; SMN2$ und den $Smn^{-/-}; SMN2$ Motoneuronen abgebildet. In der oberen Reihe sind die Motoneurone der $Smn^{+/+}; SMN2$ Kontrolltiere und in der unteren Reihe die der $Smn^{-/-}; SMN2$ dargestellt. Die Färbung erfolgte gegen das Strukturprotein Tau. Die Abbildungen A und B zeigen den deutlichen Längenunterschied der Axone der Motoneurone der $Smn^{+/+}; SMN2$ zu denen der $Smn^{-/-}; SMN2$ Tiere (Vgl. Abbildung 6; Signifikanzniveau: *). Die Abbildungen C und D verdeutlichen, dass die Axone der Kontrolltiere nach Zugabe von $0,3\mu M$ ω -Conotoxin deutlich länger auswachsen, während hingegen kein signifikanter Einfluss auf die Länge der $Smn^{-/-}; SMN2$ Motoneurone vorliegt. Die Abbildungen E und F verdeutlichen, dass sich unter der Therapie mit $0,5\mu M$ R-Roscovitine die Länge der Axone der $Smn^{-/-}; SMN2$ Motoneurone auf das Niveau der Länge der Axone der Kontrolltiere angleicht. Die Abbildungen G und H verdeutlichen zum einen erneut den Effekt der Zugabe von $0,3\mu M$ ω -Conotoxin zu den Motoneuronen der Kontrolltiere. Es zeigt sich das erneut signifikant längere Auswachsen der Axone (Vgl. Abbildung 6; Signifikanzniveau: *). Gleichzeitig zeigt sich, dass der positive Effekt der Zugabe von $0,5\mu M$ R-Roscovitine nach Zugabe von $0,3\mu M$ ω -Conotoxin aufgehoben ist. Die Axone wachsen analog der Bedingungen mit nur Zugabe von $0,3\mu M$ ω -Conotoxin aus. (Abkürzungen: \emptyset : nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

4.2 R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin

Die Daten dieser Rubrik wurden zusammen mit Herrn Dr. Benjamin Dombert akquiriert.

Aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Jablonka ist bekannt, dass die Wachstumskegel der Motoneurone $Smn^{-/-}; SMN2$ auf Laminin-221 im Vergleich zu den $Smn^{+/+}; SMN2$ Motoneuronen der Kontrolltiere eine geringere Fläche aufweisen. Dies wird analog zu dem deutlich längeren Auswachsen der Axone, als Ausdruck der nicht adäquaten Differenzierung der $Smn^{-/-}; SMN2$ -Motoneurone auf Laminin-221 gewertet. Die Frage, welche dieser Versuchsaufbau adressiert, ist, ob R-

Roscovitine in der Lage ist, die Größe der Wachstumskegel von *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneuronen, analog zu der vorher beschriebenen restitutio des axonalen Längenwachstums, zu normalisieren. Darüber hinaus ist bekannt, dass auch die Menge an β -Aktin im Areal des Wachstumskegel reduziert ist, der Einfluss von R-Roscovitine auf die β -Aktin Intensitäten wurde an denselben Zellen durchgeführt (Rossoll, Jablonka et al. 2003).

Hierfür wurden *Smn*^{+/+}; SMN2- und *Smn*^{-/-}; SMN2 -Motoneurone für insgesamt fünf Tage (DIV5) kultiviert. Es wurden pro Genotyp (*Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2) jeweils die Konditionen BDNF plus CNTF und BDNF, CNTF plus R-Roscovitine untersucht.

Es erfolgte eine Ko-Färbung mit einem Antikörper gegen β -Aktin und gegen das axonale Strukturprotein Tau. Bezogen auf die Größe der Wachstumskegel zeigte sich im Vergleich der Gruppen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2, welche ausschließlich unter Einfluss von BDNF und CNTF kultiviert wurden, der bereits beschriebene signifikante Unterschied mit deutlich kleineren Wachstumskegeln in der Gruppe der *Smn*^{-/-}; SMN2 -Motoneurone (Abb. 8 I) und Abb. 8 II) A und B). Die Zugabe von 0,5 μ M R-Roscovitine in das Kulturmedium führte zu einer restitutio der Größe der Wachstumskegel der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, so dass sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den *Smn*^{-/-}; SMN2 und den Kontrollmotoneuronen fand (Abb. 8 I) und Abb. 8 II) C und D). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Tatsache, dass R-Roscovitine in der Lage ist, die Differenzierung der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone auch bezogen auf die Ausbildung der Wachstumskegel zu normalisieren.

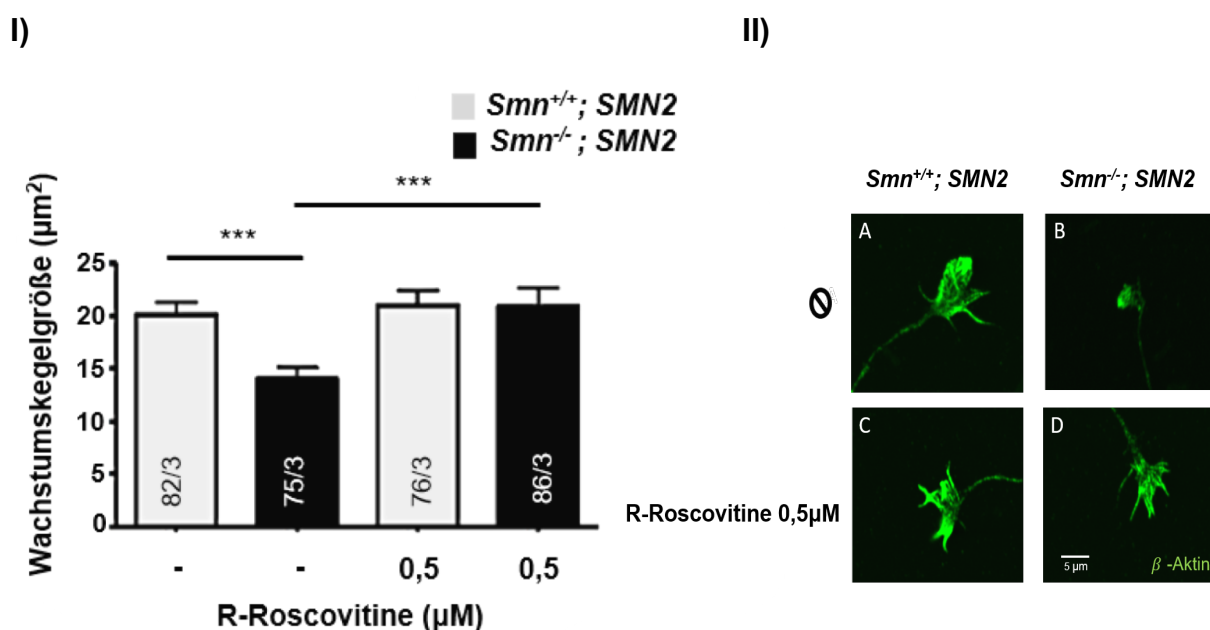


Abbildung 8: R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin

I): Dargestellt ist die Größe der Wachstumskegel in μm^2 in vitro 5 Tage auf Laminin-221 kultivierter muriner Motoneurone. Auf der Ordinatenachse ist die Wachstumskegelgröße in μm^2 aufgetragen. Auf der Abszissenachse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen β -Aktin. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen. Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der Experimente). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: $Smn^{+/+}$; SMN2; schwarz: $Smn^{-/-}$; SMN). Es zeigt sich der signifikante Größenunterschied der Wachstumskegel unter den Kulturbedingungen mit nur BDNF und CNTF (-) (Signifikanzniveau: ***). Die Behandlung mit $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine ist in der Lage diesen Phänotyp zu normalisieren, sodass die Wachstumskegel der behandelten $Smn^{-/-}$; SMN im Vergleich mit den unbehandelten $Smn^{-/-}$; SMN Motoneuronen signifikant größer sind (Signifikanzniveau: ***). (Abkürzungen: *** p-Wert $<0,001$; -: nur Zugabe von BDNF und CNTF))

II): Der zweite Teil zeigt exemplarische Abbildungen aus der Fluoreszenzmikroskopie der Färbung fünf Tage alter Motoneurone der Genotypen $Smn^{+/+}$; SMN2 und $Smn^{-/-}$; SMN2 mit einem Antikörper gegen β -Aktin (grün). Im Vergleich der Abbildungen A und B zeigt sich zum einen der signifikante Größenunterschied zwischen den Genotypen $Smn^{+/+}$; SMN2 und $Smn^{-/-}$; SMN. Darüber hinaus zeigt sich auch die deutlich höhere Intensität für β -Aktin im Falle der $Smn^{+/+}$; SMN2 Kontrolltiere. Die Zugabe von $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine führt, wie in den Abbildungen C und D dargestellt, zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, wie auch der Intensität für β -Aktin, als Ausdruck der Proteinmenge. (Abkürzungen: \emptyset : nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

Weiterhin ist aus Vorarbeiten bekannt, dass die Menge an β -Aktin, gemessen an der Intensität in der Fluoreszenzmikroskopie, in $Smn^{-/-}$; SMN2 -Motoneuronen, reduziert ist. β -Aktin spielt sowohl eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Wachstumskegels, als auch als Teil der Zytomatrix beim Ablauf der Signaltransmission (Rossoll, Jablonka et al. 2003, Jablonka, Beck et al. 2007). Es wurde eine kombinierte Färbung mit β -Aktin und Tau für die Messung der Intensitäten durchgeführt. Es wurden isoliert die ausschließlich für β -Aktin positiven Areale evaluiert. Die Ansätze entsprechen den Ansätzen für die Messung der Größe der Wachstumskegel, das heißt, es wurden erneut für $Smn^{+/+}$; SMN2- und $Smn^{-/-}$; SMN2-Motoneurone jeweils die Konditionen mit nur BDNF plus CNTF und BDNF, CNTF plus $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine untersucht. Wie aus den Vorarbeiten bekannt, zeigte sich in den Motoneuronen der $Smn^{-/-}$; SMN2 Tiere eine signifikant niedrigere Intensität von β -Aktin im Vergleich zu den $Smn^{+/+}$; SMN2- Kontrollmotoneuronen (Abb. 9 und 8 II) A und B). Die Behandlung der $Smn^{-/-}$; SMN2-Motoneurone bewirkte, analog zur restitutio der Größe der Wachstumskegel, eine Erhöhung der messbaren β -Aktin-Intensität in den $Smn^{-/-}$; SMN2-Motoneuronen, wohingegen der Einfluss auf die $Smn^{+/+}$; SMN2-Motoneurone nicht signifikant war (Abb. 9 und 8 II). C+D). Dies zeigt, dass R-Roscovitine zumindest zu einem gewissen Anteil in der Lage ist, die Zytomatrix des

Wachstumskegels wiederherzustellen bzw. an die *Smn*^{+/+}; SMN2 Situation anzugleichen. Obgleich die rein deskriptive Analyse natürlich keine Aussage über die Funktionalität erlaubt. In Konsistenz mit den vorhergehenden Experimenten ist es jedoch wahrscheinlich, dass dies auf dem Vorhandensein adäquater Differenzierungssignale im Bereich des terminalen Axons unter der Therapie mit R-Roscovitine beruht. Als Grundlage hierfür wird eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der N-Typ-Kalziumkanäle durch R-Roscovitine postuliert. Dies führt zu einer erhöhten Menge an lokalen Kalziumströmen als Grundlage der Differenzierung.

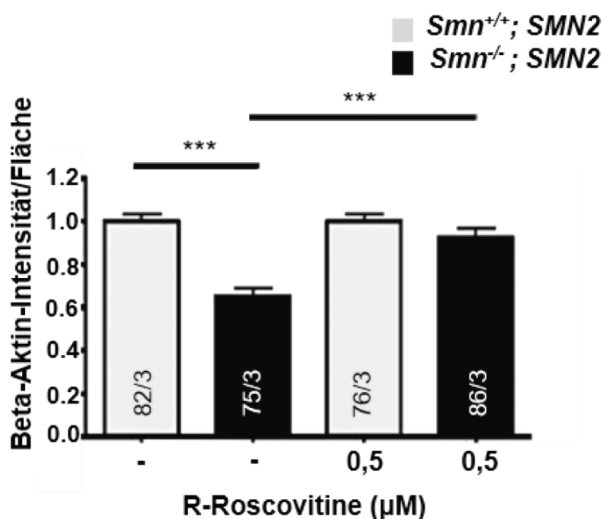


Abbildung 9: R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin

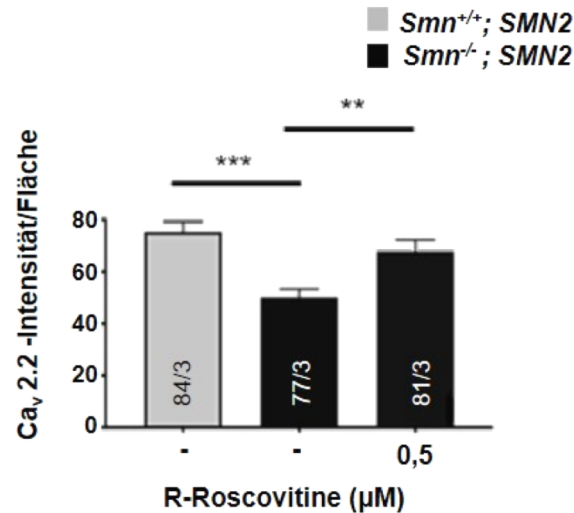
Dargestellt ist die Intensität von β -Aktin in den Wachstumskegeln von 5 Tagen *in vitro* auf Laminin-221 kultivierten murinen Motoneuronen. Auf der Ordinate ist die β -Aktin-Intensität/ Fläche aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen β -Aktin. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen.

Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der Experimente). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: *Smn*^{+/+}; SMN2; schwarz: *Smn*^{-/-}; SMN). Es zeigt sich die erwartete signifikant niedrigere Intensität für β -Aktin in den Wachstumskegeln der *Smn*^{-/-}; SMN Motoneurone im Vergleich mit denen der Kontrolltiere *Smn*^{+/+}; SMN2 (Signifikanzniveau: ***). Die Zugabe von R-Roscovitine führt zu einer deutlich höheren messbaren Intensität für β -Aktin in den Motoneuronen der *Smn*^{-/-}; SMN Tiere im Vergleich mit den unbehandelten Tieren (Signifikanzniveau: ***). Die Intensität für β -Aktin in den *Smn*^{+/+}; SMN2 wird nicht beeinflusst. (Abkürzungen: *** p-Wert <0,001; \emptyset : nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

4.3 R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Intensität der Ca_v2.2-Kalziumkanäle am Wachstumskegel

Dieser Ergebnissteil wurde ebenfalls unter Mitarbeit von Dr. Benjamin Dombert erstellt. Wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten erläutert, umfasst eine Krankheitstheorie der spinalen Muskelatrophie die Störung der Kalziumströme entlang des Axons, aber vor allem auch im Bereich des terminalen Axons, dem sogenannten Wachstumskegel. Diese gestörte Kalziumtransmission konnte bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Jablonka nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür scheinen eine gestörte Anordnung der Kalziumkanäle zu sogenannten Clustern und eine insgesamt niedrigere Anzahl an N-Typ-Kalziumkanälen im Bereich der Axonterminalen zu sein. Dies führt zu einer nicht adäquaten Signaltransmission und ausbleibenden Maturations- bzw. Differenzierungssignalen (Jablonka, Beck et al. 2007). Aus diesem Grund wurde in diesem Versuchsaufbau untersucht, ob R-Roscovitine in der Lage ist, die Intensität des Ca_v2.2 N-Typ-Kalziumkanals, als Ausdruck der Proteinmenge, im Bereich des Wachstumskegel auf das *Smn*^{+/+}; SMN2 Niveau zu normalisieren. Die Intensität wurde an fünf Tagen auf Laminin-221 kultivierten Motoneuronen (DIV 5) untersucht. Es erfolgte eine Ko-Färbung mit einem Antikörper gegen den Ca_v2.2N-Typ Kalziumkanal und gegen das axonale Strukturprotein Tau sowie gegen β -Aktin. Die Messungen wurden im Bereich des Wachstumskegels durchgeführt, welcher als nicht Tau positives Areal definiert wurde. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen von drei Muttertieren analog zu den anderen Protokollen durchgeführt. Im Vergleich der Ansätze *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 isoliert mit BDNF und CNTF zeigte sich der bereits bekannte Unterschied mit einer signifikant verminderten Intensität im Falle der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone. Die Zugabe von 0,5 μ M R-Roscovitine zu den Motoneuronen des Genotyps *Smn*^{-/-}; SMN2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der messbaren Intensität für den Ca_v2.2 N-Typ-Kalziumkanal, als Ausdruck einer erhöhten Anzahl im Bereich der Axonterminalen (Abb. 10 I) und 10 II) A bis C). Dies ist Grundlage der adäquaten Differenzierung der Motoneurone in vivo. In Vorarbeiten von Herrn Dr. Hans Drexel konnte bereits gezeigt werden, dass R-Roscovitine keinen signifikanten Einfluss auf die Intensität des Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanals in den Motoneuronen *Smn*^{+/+}; SMN2 hat.

I).



II).

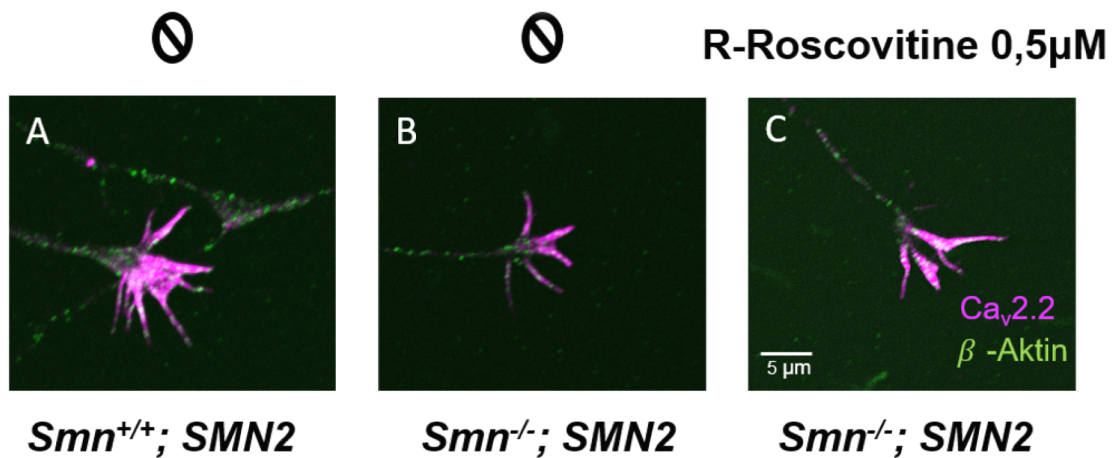


Abbildung 10 I). und II.): R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Intensität des Ca_v2.2 Kalziumkanals

I). Dargestellt ist die Intensität des Ca_v2.2. Kalziumkanals in den Wachstumskegeln von 5 Tagen *in vitro* auf Laminin-221 kultivierten murinen Motoneuronen. Auf der Ordinatenachse ist die Ca_v2.2-Kalziumkanal-Intensität/ Fläche aufgetragen. Auf der Abszissenachse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen β-Aktin sowie den Ca_v2.2-Kalziumkanal. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen. Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der Experimente). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: Smn^{+/+}; SMN2; schwarz: Smn^{-/-}; SMN). Aufgrund einer geringen Anzahl an Smn^{+/+}; SMN2 Tieren in den Würfeln wurde hier nur die Situation in den Smn^{-/-}; SMN Tieren untersucht worden. Es zeigt sich zum einen, dass die Intensität für den Ca_v2.2-Kalziumkanal in den Motoneuronen der unbehandelten Smn^{-/-}; SMN Tiere im Vergleich mit den Kontrolltieren signifikant niedriger ist (Signifikanzniveau: ***). Unter der Therapie mit 0,5μM R-Roscovitine kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Intensität für den Ca_v2.2-Kalziumkanal in den Wachstumskegeln der Motoneurone der Smn^{-/-}; SMN Tiere (Signifikanzniveau: **). (Abkürzungen: ** p-Wert < 0,01 *** p-Wert < 0,001; -: nur Zugabe von BDNF und CNTF)

II). Der zweite Teil zeigt exemplarische Abbildungen aus der Fluoreszenzmikroskopie der Färbung fünf Tage alter Motoneurone der Genotypen Smn^{+/+}; SMN2 und Smn^{-/-}; SMN2 mit einem Antikörper gegen β-Aktin (grün), sowie gegen den Ca_v2.2-Kalziumkanal (Magenta). Im Vergleich der Abbildungen A und B zeigt sich die signifikant niedrigere Intensität der Motoneurone der Smn^{-/-}; SMN Tiere. Die Zugabe von 0,5μM R-Roscovitine führt, wie in Abbildungen C dargestellt, zu einer Normalisierung der der Intensität für den Ca_v2.2-Kalziumkanal, als Ausdruck der Proteinmenge. (Abkürzungen: \emptyset : nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

4.4 S-Roscovitine führt nicht zu einer Normalisierung der Axonlängen auf Laminin-221

Wie in der Einleitung beschrieben, beeinflusst R-Roscovitine die Neurone über zwei verschiedene Mechanismen. Auf der einen Seite ist es ein potenter Modulator des Zellzyklus. Neben CDK 1,2,7 und 9 ist es vor allem ein potenter Inhibitor der in neuronalen Strukturen vermehrt nachweisbaren CDK5 (Bach, Knockaert et al. 2005, Cicenias, Kalyan et al. 2015). CDK 5 beeinflusst intrazelluläre Signalwege auf mannigfaltige Art und Weise und ist ein Mediator der Apoptose von Neuronen, zum Beispiel im Falle von hypoxischem Stress. Interessanterweise kann auch eine gestörte Calciumkonzentration über CDK 5 abhängige Signalwege zur Apoptose eines Neurons führen (Lopes, Oliveira et al. 2009, Lopes and Agostinho 2011).

Auf der anderen Seite ist eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit unter anderem der $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanäle durch R-Roscovitine mehrfach nachgewiesen worden (Buraei, Angheliescu et al. 2005, Buraei, Schofield et al. 2007, Buraei and Elmslie 2008, Buraei and Yang 2010, DeStefino, Pilato et al. 2010, Buraei, Liang et al. 2014, Buraei, Lee et al. 2015, Buraei and Yang 2015). Es stellt sich nun die Frage, welcher dieser Effekte entscheidend für die Normalisierung des Längenwachstums der Axone, der Größe der Wachstumskegel, sowie der Intensität für β -Aktin und den $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal im Bereich des Wachstumskegels verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden vergleichende Untersuchungen mit R-Roscovitine und dem entsprechenden Enantiomer S-Roscovitine durchgeführt. Für S-Roscovitine konnte eine Inhibition des Zellzyklus über eine Modulation der CDK 5 analog zu R-Roscovitine gezeigt werden (Cho and Meriney 2006). Im Gegensatz zu R-Roscovitine konnte für S-Roscovitine im hier angewandten Konzentrationsbereich allerdings keine relevante Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit für den $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal gezeigt werden, da sich die EC_{50} der beiden Substanzen, bezogen auf die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Kalziumkanäle, um den Faktor 20 unterscheiden (siehe auch 1.4.3 und Tab. 8) (Buraei and Elmslie 2008). In diesem Versuchsaufbau wird daher das Längenwachstum von sieben Tage kultivierten Motoneuronen (DIV 7) auf Laminin-221 untersucht. Es wurden pro Genotyp $Smn^{+/+}$; SMN2 und $Smn^{-/-}$; SMN2 drei Konditionen verglichen:

- BDNF + CNTF
- BDNF + CNTF + 0,5 μ M R-Roscovitine

- BDNF + CNTF + 0,5µM S-Roscovitine

Im Vergleich der *Smn*^{+/+}; SMN2- und *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone zeigte sich der bekannte, signifikante Längenunterschied zwischen den beiden Gruppen mit insgesamt deutlich kürzer auswachsenden *Smn*^{+/+}; SMN2-Motoneuronen, als Zeichen der adäquaten Differenzierung (Abb. 11 und Abb. 12 A und B).

Die Kultivierung der beiden Gruppen mit Zugabe von 0,5µM R-Roscovitine in das Kulturmedium führte erneut zu einer signifikanten Restitutio des gestörten Längenwachstums der *Smn*^{-/-}; SMN2. Auch in diesem Versuch zeigte sich im Vergleich der Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 kein signifikanter Unterschied im Längenwachstum nach Kultivierung in Gegenwart von 0,5µM R-Roscovitine (Abb. 11 und Abb. 12 C und D). Die Zugabe von 0,5µM S-Roscovitine hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Auswachsen der *Smn*^{+/+}; SMN2-Motoneurone. Es zeigte sich jedoch auch keine signifikante Änderung der Axonlängen der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone im Vergleich zum Längenwachstum ebendieser, unter den ersten Konditionen mit nur BDNF und CNTF im Medium. Der Unterschied zwischen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 bezogen auf das Längenwachstum unter den Bedingungen BDNF + CNTF + 0,5µM S-Roscovitine war, bezogen auf das deutlich längere Auswachsen der Axone der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, als Ausdruck einer erneut gestörten Differenzierung, analog zu der ersten Bedingung signifikant (Abb. 11 und Abb. 12 E+F).

Aufgrund der Tatsache, dass S-Roscovitine nicht in der Lage ist, das gestörte Längenwachstum der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone auf Laminin-221 zu normalisieren ist es unwahrscheinlich, dass die Inhibition von CDK 5, obwohl CDK 5 über verschiedenste Wege zur Apoptose neuronaler Zellen führen kann, ursächlich für die Normalisierung des Phänotyps der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone nach Zugabe von R-Roscovitine ist. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanäle entscheidend für die adäquate Differenzierung ebendieser Motoneurone ist.

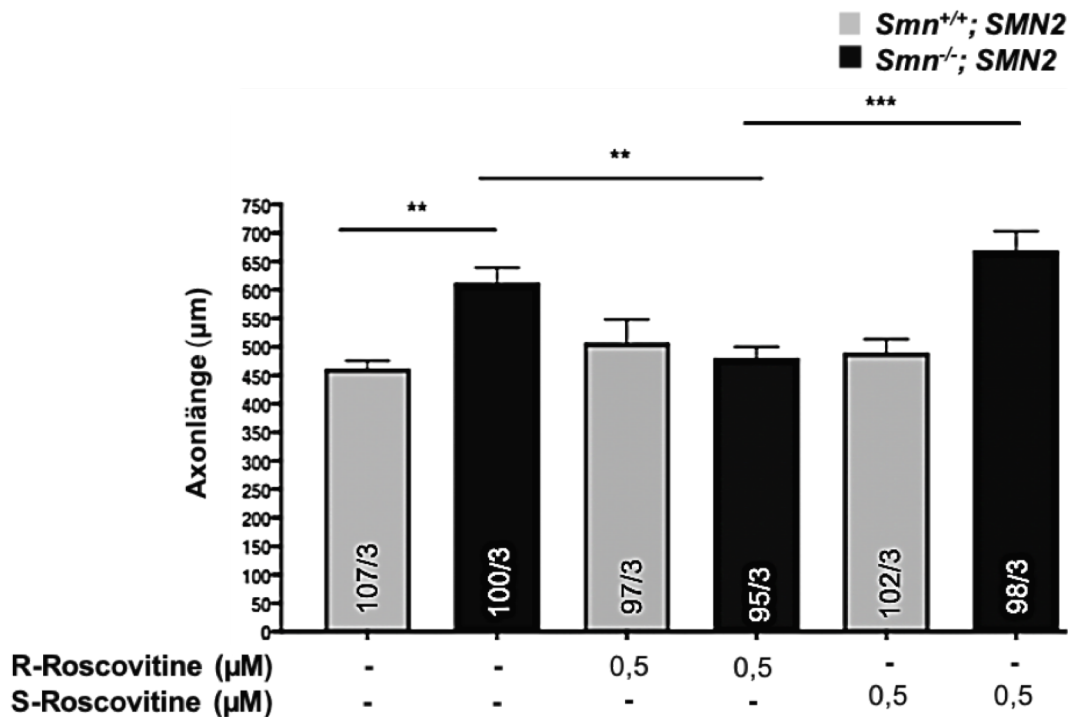


Abbildung 11: S-Roscovitine führt nicht zu einer Normalisierung der Axonlängen auf Laminin-221

Dargestellt ist das Längenwachstum 7 Tage *in vitro* auf Laminin-221 kultivierter muriner Motoneurone. Auf der Ordinatennachse ist die Axonlänge in μm aufgetragen. Auf der Abszissenachse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen das Strukturprotein Tau. Je nach Ansatz wurden dann entsprechend $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine oder $0,5\mu\text{M}$ S-Roscovitine zugesetzt. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen. Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der Experimente). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: Smn^{+/+}; SMN2; schwarz: Smn^{-/-}; SMN2). Es zeigt sich der bekannt signifikante Längenunterschied der beiden Genotypen unter den Bedingungen mit nur BDNF und CNTF mit deutlich längeren Axonen der Smn^{-/-}; SMN2-Motoneurone (Signifikanzniveau: **). Die Behandlung mit $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine führt erneut zu einer Restitutio des Längenwachstums auf Laminin-221, so dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Kontroll-Motoneuronen Smn^{+/+}; SMN2 und den Smn^{-/-}; SMN2 (Signifikanz der Gruppen mit nur $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine: nicht signifikant), während hingegen ein signifikanter Unterschied zwischen den Smn^{-/-}; SMN2 Zellen ohne Zusatz und mit Zusatz von $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine vorlag (Signifikanzniveau: **).

Die Zugabe von $0,5\mu\text{M}$ S-Roscovitine führt jedoch zu keiner signifikanten Änderung der Axonlängen. Die Situation ist analog zu der Kultivierung nur in Gegenwart von BDNF und CNTF. Der positive Effekt der Zugabe von $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass R-Roscovitine in der Lage ist den Längenphänotyp von Axonen der Smn^{-/-}; SMN2-Motoneuronen zu normalisieren. Die Zugabe von S-Roscovitine hat jedoch keinen Einfluss. In der hier eingesetzten Konzentration, hat S-Roscovitine keinen agonistischen Einfluss auf den Ca_v2.2-Kalziumkanal, sodass der positive Effekt von R-Roscovitine wahrscheinlich auf die Modulation des Ca_v2.2-Kalziumkanal zurückzuführen ist. (Abkürzungen: n.s.: nicht signifikant, **: p-Wert <0,01; *** p-Wert <0,001; -: nur Zugabe von BDNF und CNTF, SMN: survival motoneuron)

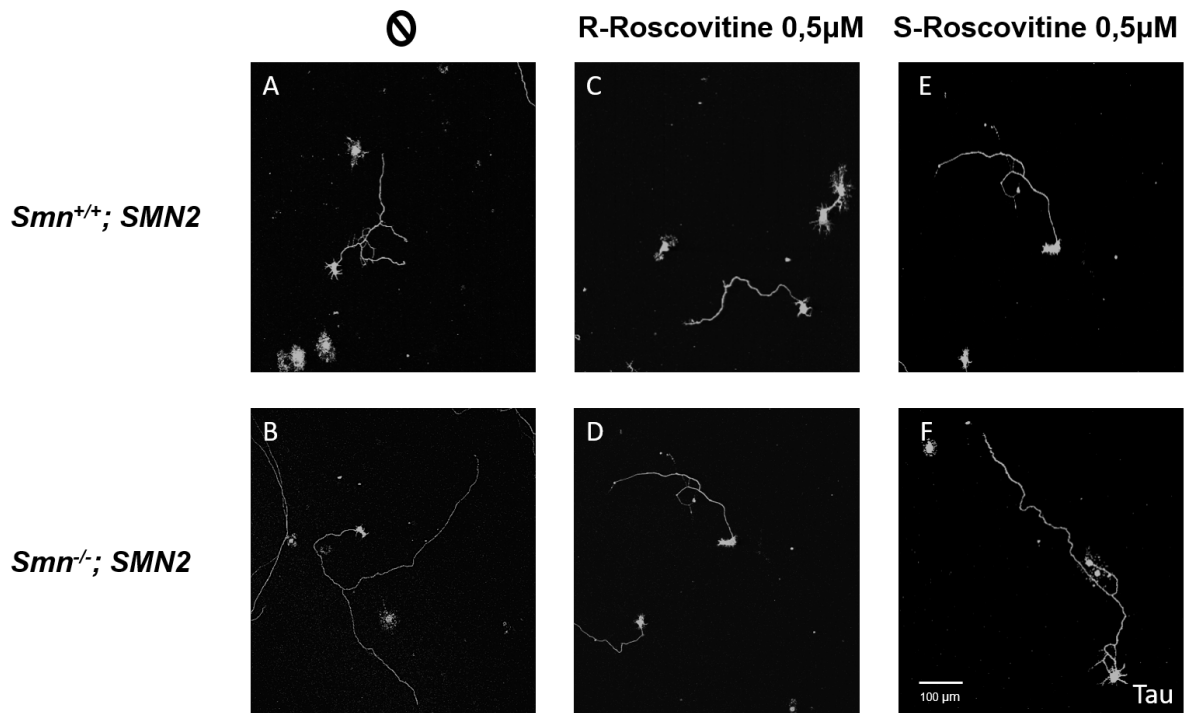


Abbildung 12: Exemplanische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Motoneuronen auf Laminin-221 nach Kultivierung mit R-Roscovitine und S-Roscovitine

Entsprechend der in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse sind exemplarische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von $Smn^{+/+}; SMN2$ und den $Smn^{-/-}; SMN2$ Motoneuronen abgebildet. In der oberen Reihe sind die Motoneurone der $Smn^{+/+}; SMN2$ Kontrolltiere und in der unteren Reihe die der $Smn^{-/-}; SMN2$ abgebildet. Die Färbung erfolgte gegen das Strukturprotein Tau. Die Abbildungen A und B zeigen den deutlichen Längenunterschied der Axone der Motoneurone der $Smn^{+/+}; SMN2$ zu denen der $Smn^{-/-}; SMN2$ Tiere (Vgl. Abbildung 11; Signifikanzniveau: **). Die Abbildungen C und D verdeutlichen, nochmals den positiven Effekt von R-Roscovitine auf das Längenwachstum der $Smn^{-/-}; SMN2$ -Motoneurone. Die Abbildungen C und F verdeutlichen, dass sich unter der Therapie mit $0,5\mu M$ S-Roscovitine die Länge der Axone der $Smn^{-/-}; SMN2$ -Motoneurone nicht signifikant beeinflusst wird. Es zeigt sich das erneut signifikant längere Auswachsen der Axone der $Smn^{-/-}; SMN2$ -Motoneurone. Dies legt eine direkte Beeinflussung der Kalziumkanäle durch R-Roscovitine nahe. (Abkürzungen: Ø : nur Zugabe von BDNF und CNTF, **: p-Wert $<0,01$, SMN: survival motoneuron)

4.5 Die Proteinmenge an CDK 5 ist im Falle der spinalen Muskelatrophie nicht erhöht, und der Einsatz von R-Roscovitine beeinflusst die CDK 5-Proteinmenge nicht

Aufgrund der komplexen Einflüsse von CDK 5, bezogen auf die Degeneration bzw. Apoptose von Neuronen und den positiven Effekt von R-Roscovitine in vitro, stellte sich die Frage nach einer möglichen Erhöhung der Menge an CDK 5 im Falle der spinalen Muskelatrophie. Dies würde einen möglichen Einfluss von CDK 5 auf Gen- bzw. Proteinebene nahelegen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden je drei Western Blots von fünf Tage alten Motoneuronkulturen (DIV 5) durchgeführt. Zum

einen wurden die Proteinmengen für CDK 5 für die Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 nach fünftägiger Kultivierung in Gegenwart von BDNF und CNTF verglichen. Dies erfolgte sowohl mit Aktin als Kontrollprotein, welches ubiquitär exprimiert wird und für das kein Unterschied im Falle der SMA beschrieben ist, als auch mit GAPDH als Kontrollprotein. Zusätzlich wurde mit GAPDH als Kontrollprotein eine Analyse von fünf Tage alten Motoneuronen nach Zugabe von 0,5µM R-Roscovitine durchgeführt. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich kein Unterschied in der Proteinmenge von CDK 5 zwischen *Smn*^{+/+}; SMN2- und *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneuronen, weder mit Aktin noch mit GAPDH als Kontrollprotein. Darüber hinaus ergab sich auch kein Unterschied in der Proteinmenge durch die Behandlung mit R-Roscovitine (Abb. 13 A und B). Die Auswertung der Intensitäten der Banden erfolgte mit Image-J (vgl. Kapitel 3.3.2.).

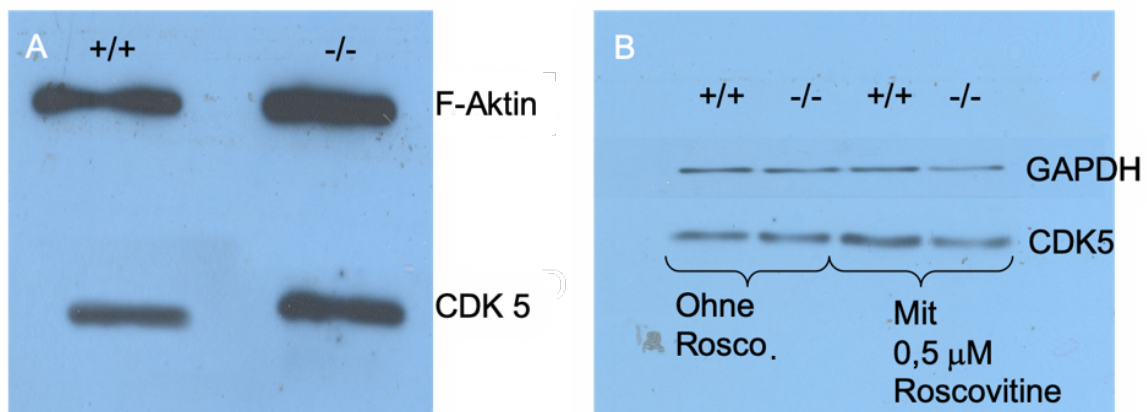


Abbildung 13: Die Proteinmenge an CDK 5 ist im Falle der spinalen Muskelatrophie nicht erhöht, und der Einsatz von R-Roscovitine beeinflusst die CDK 5-Proteinmenge nicht

A): Oberhalb der Banden ist der jeweilige Genotyp der Tiere aufgetragen. In diesem Western blot wurde Aktin als Kontrollprotein verwendet. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert. Die Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Menge an Aktin oder CDK 5 (Cyclin dependent kinase 5) im Vergleich der Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2.

B): Oberhalb der Banden ist der jeweilige Genotyp der Tiere aufgetragen. In diesem Western blot wurde Aktin als Kontrollprotein verwendet. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert. Unterhalb der Banden ist die Zugabe von R-Roscovitine angegeben. Als Kontrollprotein wurde hier GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Es zeigt sich zunächst, dass auch in diesem Ansatz kein signifikanter Unterschied zwischen den *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 bezogen auf die Menge an CDK 5 und GAPDH vorliegt. Die Zugabe von R-Roscovitine führt nicht zu einer signifikanten Änderung der Proteinmenge. (Abkürzungen: +/+ : *Smn*^{+/+}; SMN2; -/- : *Smn*^{-/-}; SMN2; Rosco.: R-Roscovitine, SMN: survival motoneuron)

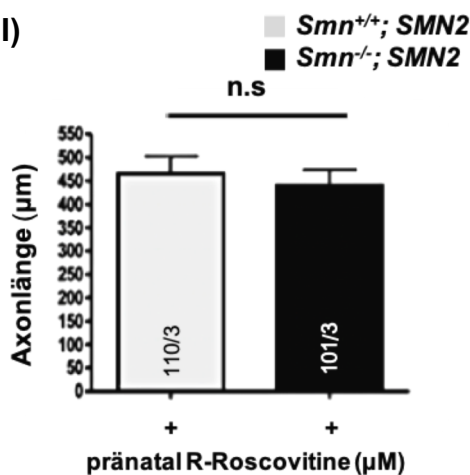
Die Tatsache, dass die Proteinmenge an CDK 5 zum einen keinen Unterschied zwischen den Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 aufwies und zum anderen die Behandlung mit R-Roscovitine die Menge an Protein nicht signifikant beeinflusst, legt nahe, dass die Wirkung von R-Roscovitine eher auf einer lokalen Erhöhung der

Kalziumströme, denn auf einer genetischen Ebene beruht. Wobei einschränkend festzuhalten ist, dass dieser Versuchsaufbau keine Aussage über die Funktionalität bzw. Aktivität von CDK 5 zulässt.

4.6 Die pränatale Behandlung des Muttertiers mit 0,5µM R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des Längenwachstums auf Laminin-221

In dem Verständnis, dass es sich bei der spinalen Muskelatrophie um eine neurodegenerative Erkrankung handelt, die sich bereits in der pränatalen Entwicklung manifestiert, wurde die Idee geboren, die Therapie mit Roscovitine bereits pränatal zu beginnen. Je nach Anzahl der Kopien können die Tiere postnatal zwar anfangs noch asymptomatisch sein, nichtsdestotrotz liegen auch hier bereits strukturelle Veränderungen vor (Iannaccone 1990, Russman, Buncher et al. 1996, Iannaccone 1998). Aufgrund der Tatsache, dass R-Roscovitine in den Vorexperimenten in der Lage war bei postnataler Applikation den Phänotyp zu normalisieren, wurde in diesem Ansatz das schwangere Muttertier ab Embryonaltag 2 alle zwei Tage mit R-Roscovitine in einer Konzentration von 2mg/kg behandelt. Analog zu dem Versuchsaufbau aus Abschnitt 5.1 wurden Motoneuronkulturen 13,5 Tage alter muriner Embryonen angelegt. Die Kulturen wurden nur in Anwesenheit von BDNF und CNTF im Medium 7 Tage (DIV 7) kultiviert, das heißt es wurde postnatal kein R-Roscovitine appliziert. Auch in diesem Versuchsaufbau erfolgte nach sieben Tagen die Fixierung und Färbung der Motoneurone. Es zeigte sich in den drei Messungen, bezogen auf die Axonlänge, kein signifikanter, phänotypischer Unterschied mehr zwischen Kulturen der Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und *Smn*^{-/-}; SMN2 (Abb. 14 I) und 14 II) A und B).

II)



I)

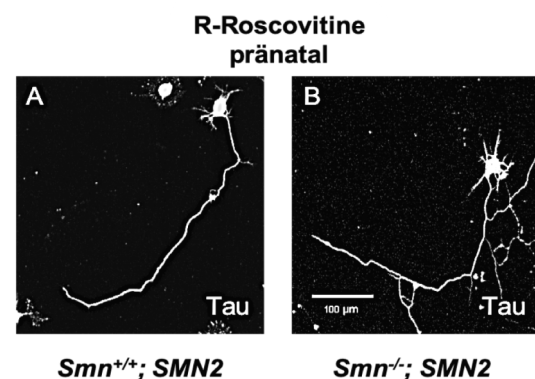


Abbildung 14I) und II): Die pränatale Behandlung des Muttertiers mit 0,5µM R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des Längenwachstums auf Laminin-221

I): Dargestellt ist das Längenwachstum 7 Tage *in vitro* auf Laminin-221 kultivierter muriner Motoneurone. Auf der Ordinatenachse ist die Axonlänge in µm aufgetragen. Auf der Abszissenachse sind die Kulturbedingungen aufgetragen. Alle Zellen wurden in Gegenwart von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) kultiviert und die Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen das Strukturprotein Tau. Alle Tiere wurden pränatal ab Embryonaltag 2 alle zwei Tage mit R-Roscovitine in einer Konzentration von 2mg/kg KG behandelt. Die einzelnen Säulendiagramme spiegeln den Mittelwert der Axonlängen wider. Oberhalb des Säulendiagrammes ist die Standardabweichung aufgetragen. Innerhalb der einzelnen Säulen ist die Anzahl der untersuchten Zellen für den jeweiligen Ansatz, sowie die Anzahl der Experimente insgesamt aufgetragen (Anzahl der Zellen/Anzahl der untersuchten Würfe). Die Farbe der Säulendiagramme gibt den Genotyp der Zellen an (grau: *Smn*^{+/+}; SMN2; schwarz: *Smn*^{-/-}; SMN). Es zeigt sich nach Behandlung der Muttertiere kein signifikanter Längenunterschied der Axone der beiden Genotypen unter den Bedingungen mit nur BDNF und CNTF postnatal (Signifikanzniveau: n.s.). (Abkürzungen: n.s: nicht signifikant, SMN: survival motoneuron)

II): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Smn*^{+/+}; SMN2 und den *Smn*^{-/-}; SMN2 Motoneuronen abgebildet. In der oberen Reihe sind die Motoneurone der *Smn*^{+/+}; SMN2 Kontrolltiere und in der unteren Reihe die der *Smn*^{-/-}; SMN2 abgebildet. Die Färbung erfolgte gegen das Strukturprotein Tau. Der Vergleich der Abbildungen A und B verdeutlicht, dass kein signifikanter Unterschied mehr im Längenwachstum der Axone der Genotypen *Smn*^{+/+}; SMN2 und den *Smn*^{-/-}; SMN2 vorliegt. (Abkürzungen: n.s: nicht signifikant, SMN: survival motoneuron)

Die Tatsache, dass Roscovitine wenn es *in vivo* in das schwangere Muttertier appliziert wird, zu einer Normalisierung des postnatalen Phänotyps der Motoneurone von murinen Embryonen mit dem Genotyp *Smn*^{-/-}; SMN2 führt, ist unter der Annahme, dass es sich bei der SMA um eine Entwicklungsstörung mit bereits intrauterin beginnender Neurodegeneration handelt, sehr vielversprechend und im Hinblick auf eine mögliche klinische Applikation hochinteressant.

Diese Daten dienen als Grundlage der von Frau PD. Dr. Jablonka und Frau Sendtner durchgeführten *in vivo*-Analysen des Einsatzes von R- bzw. S-Roscovitine an Mäusen. Hierfür wurden Muttertiere analog zu der Versuchsreihe der kultivierten Motoneurone mit R-Roscovitine behandelt. Die Behandlung erfolgte ab Embryonaltag 11,5 bis 17,5 in einer Konzentration von 2mg/kg. Bereits im Vorfeld war bekannt, dass R-Roscovitine bei postnataler Applikation zu einer Lebensverlängerung der betroffenen Tiere führt. Dieser Effekt konnte durch die bereits pränatale Applikation von R-Roscovitine noch verstärkt werden (Tejero, Balk et al. 2020).

5. Diskussion

Die Geschichte der spinalen Muskelatrophie reicht zurück bis in das späte 19. Jahrhundert. 1890 beschrieb Guido Werdnig, ein aus Graz stammender und an der Universität zu Wien praktizierender Neurologe, einen Fall von „Muskeldystrophie mit positiven Rückenmarksbefunden“. Darauf folgte im Jahre 1891 eine Veröffentlichung über zwei Fälle einer progressiven Muskelatrophie im Kindesalter. Wesentlich geprägt wurde die Krankheitsbezeichnung „Spinale Muskelatrophie“ dann von dem deutschen Neurologen Professor Johann Hoffmann. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichungen war dieser an der Universität zu Heidelberg tätig. Die 1892 unter den Titeln „Ueber familiäre progressive spinale Muskelatrophie“ und „Ueber chronische progressive Muskelatrophie“ veröffentlichten Arbeiten gelten zusammen mit denen von Werdnig als grundlegend in der Entdeckung dieser Erkrankung und fassen bereits umfassend das möglich Symptomspektrum zusammen (Iannaccone 1998). In der Analyse familiärer Fälle von SMA wurde ein heterozygoter Erbgang postuliert (Pearn 1973, Pearn, Hudgson et al. 1978, Pearn 1980). In einer Studie mit über 72.400 humanen Proben wurde 2012 eine Heterozygotenfrequenz von 1:54 und eine Inzidenz von 1:11.000 beschrieben (Sugarman, Nagan et al. 2012). Somit ist die spinale Muskelatrophie, nach der zystischen Fibrose (Inzidenz 1:3000) für unsere Breitengrade, die zweithäufigste Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang und der Möglichkeit eines letalen Verlaufes bei Kindern (O'Sullivan and Freedman 2009). Diese Zahlen implizieren die Relevanz der Erforschung der spinalen Muskelatrophie und darauf aufbauend die Entwicklung adäquater therapeutischer Strategien. Während hingegen viele therapeutische Ansätze sich heute mit der Möglichkeit der Erhöhung der Menge an SMN-Protein befassen, wurde in dieser Arbeit der Einsatz eines in klinischen Studien erprobten Zellzyklusinhibitors, welcher zusätzlich konzentrationsabhängig, agonistische Eigenschaften am Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanal besitzt, beschrieben (Buraei, Anghelescu et al. 2005, Kolb and Kissel 2015). Diese Therapie ist zwar im Vergleich zu den Ansätzen der Erhöhung der Menge nicht als kausale Therapie zu verstehen, sie bietet allerdings den großen Vorteil, dass R-Roscovitine bereits in einem anderen Kontext in klinischen Studien erprobt ist, und somit der Zugang zu diesem Medikament einfacher ist. Tabelle 7 gibt nochmals einen Überblick über die aktuellen Therapieoptionen bzw. möglicher therapeutischer Strategien.

Quelle	Jahr	SMA-Meilenstein
Werdnig ¹	1891	Erstbeschreibung der SMA Typ I
Hoffmann ²	1893	Beschreibung weiterer Fälle der SMA Typ I
Kugelberg, Welander (Kugelberg and Welander 1956)	1956	Erstbeschreibung SMA Typ III
Dubowitz (Dubowitz 1967)	1967	Erstmals wird postuliert, dass es drei potenzielle Erkrankungsverläufe gibt
Munsat ³	1991	Konsens SMA Typ I-III
Lefebvre (Lefebvre, Burglen et al. 1995)	1995	Identifikation des SMN-Gens
Andreass (Andreassi, Jarecki et al. 2001)	2001	Erstbeschreibung Erhöhung der SMN-Menge durch „small molecule therapy“
Lim, Hertel (Lim and Hertel 2001)	2001	Erstbeschreibung Erhöhung der SMN-Menge durch „antisense nucleotide“
Chang (Chang, Hsieh-Li et al. 2001)	2001	Erste präklinische Studie mit „small molecules“
Mercuri (Mercuri, Bertini et al. 2007)	2007	Erste klinische Studie mit „small molecules“
Wang	2007	Konsensuspapier zur Standardtherapie der SMA
Hua; Dickson; Coady (Coady, Baughan et al. 2008, Dickson, Osman et al. 2008, Hua, Vickers et al. 2008)	2008	Erste präklinische Studien RNA basierter Therapie
Foust; Passini; Dominguez (Foust, Wang et al. 2010, Passini, Bu et al. 2010, Dominguez, Marais et al. 2011)	2010	Erste präklinische Studien zur Gentherapie der SMA Typ 1
FDA (Federal Drug Administration)	2016	Erstzulassung eines „antisense oligonucleotids“ Nusinersen (Spinraza®)
Finkel (Finkel, Mercuri et al. 2017)	2017	Erste Ergebnisse klinischer Studien das „antisense Oligonukleotide“ zu einer Symptomverbesserung und Verbesserung der Gesamtprognose führen
Wurster (Wurster and Gunther 2020)	2019	Zulassung von Nusinersen durch die EMA
Wurster (Wurster and Gunther 2020)	2020	Beantragung der Zulassung des Medikaments Zolgensma als erstes Adenovirus Vektor getragenes Gensatztherapeutikum bei der EMA

Tabelle 7: Meilensteine im Krankheitsverständnis und in der Therapie der SMA

(Abkürzungen: SMA: spinale Muskelatrophie; SMN-Gen: survival motoneuron Gen; RNA: Ribonukleinsäure; EMA: Europäische Arzneimittel Agentur)

¹ Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage Arch Psychiatr Nervenkr. 189

² Hoffmann J. Über chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter auf familiärer Basis. Deut Zeitsch Nervenheilkd. 1893;3(6)

³ Munsat TL. Workshop report: international SMA collaboration. NeuromusculDisord. 1991;1(2):81

⁴ Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, et al; Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. J Child Neurol. 2007

5.1 Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine zu einer restitutio des axonalen Wachstums in der Zellkultur?

Durch vorherige Untersuchungen des bereits etablierten murinen Modells für die spinale Muskelatrophie, wurden bereits wesentliche pathologische Veränderungen von kultivierten Motoneuronen beschrieben (Rossoll, Jablonka et al. 2003, Jablonka, Beck et al. 2007). Phänotypisch zeigen Motoneurone des untersuchten Mausmodells bei Vorliegen des Genotyps *Smn*^{-/-}; *SMN2* in Kultur verschiedene Auffälligkeiten. Kultiviert man diese Neurone sieben Tage auf Laminin-221 zeigt sich, dass die Axone deutlich länger auswachsen. In korrespondierenden Untersuchungen an fünf Tage alten Motoneuronen zeigte sich zusätzlich, dass das Areal der Wachstumskegel deutlich kleiner ist, und die Intensitäten, als Ausdruck der Menge an Protein, für β -Aktin und den Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanal deutlich reduziert sind. Gleichzeitig wurden auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass die spontanen Kalziumströme lokal an der Endplatte deutlich reduziert sind (Jablonka, Beck et al. 2007). Um den Versuchsaufbau zu verifizieren, wurden diese bereits bekannten phänotypischen Veränderungen in vitro auf Laminin-221 bestätigt. Es wurde gezeigt, dass die Motoneurone des Genotyps *Smn*^{-/-}; *SMN2* im hier verwendeten Versuchsaufbau ein deutlich längeres Axon aufweisen (Abb. 6 und 7). Auch sind die Wachstumskegel der *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneurone deutlich kleiner, sowie die Intensitäten für β -Aktin und den Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanal deutlich geringer. (Abb. 8 bis 10).

Diese Tatsache validiert den hier verwendeten Versuchsaufbau und legt nahe, dass die gewonnenen Ergebnisse belastbar sind.

Die Hypothese, die etabliert wurde, um diese phänotypischen und funktionellen Alterationen der *Smn*^{-/-}; *SMN2*-Motoneuronen zu erklären, beruht auf der Annahme, dass lokale Kalziumströme innerhalb des Neurons eine zentrale Rolle als Differenzierungssignal spielen.

Konkret heißt das für die Kultivierung auf Laminin-221, dass die Laminin-221 assoziierten Differenzierungssignale nicht erkannt werden und das Axon somit unkontrolliert auswächst, also keine Maturation bzw. Differenzierung stattfindet. Bereits Ende der 1980er und Anfang der 90er Jahre wurde beschrieben, dass ein lokaler Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration im Areal des Wachstumskegels, ausgelöst durch die Öffnung spannungsabhängiger

Kalziumkanäle, eine Vesikelfreisetzung bewirkt (Probst 1982, Cohan, Connor et al. 1987).

Neben der Vesikelfreisetzung als Ausdruck der interzellulären Interaktion, spielt der Anstieg der Kalziumkonzentration auch bei der intrazellulären Signalvermittlung als Bestandteil zahlreicher Signalwege eine entscheidende Rolle.

Der intrazelluläre Kalziumanstieg führt unter anderem zu einer Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen und spielt eine Rolle bei der Regulation transkriptionaler und translationaler Prozesse. Untersuchungen an sich entwickelnden Neuronen konnten zeigen, dass im Laufe des Entwicklungsprozesses eine Änderung lokaler Kalziumströme stattfindet (Gu, Olson et al. 1994, Gu and Spitzer 1995).

In denselben Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition dieser Kalziumströme mit einer deutlichen Veränderung der Differenzierung der Neurone verbunden ist. Die Ströme die bei der Differenzierung eine Rolle spielen, sind vor allem sogenannte „wave patterns“ und „spike patterns“. Die „wave patterns“ mit regelmäßigen Anstiegen und Abfällen, sind vor allem bei der Regulation des Auswachsens der Neurite relevant, während hingegen die „spike patterns“ mit hohen Amplituden vorwiegend eine Rolle bei der strukturellen Ausbildung des terminalen Axons spielen (Gu and Spitzer 1995). Vor allem die strukturelle Ausbildung des Zytoskeletts und Anordnung der Kalziumkanäle ist essentiell, um die intrazelluläre Kalziumkonzentration in einem ausreichenden Maß zu erhöhen. Die Anordnung der Kalziumkanäle zu Clustern spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Interessanterweise scheint es im Rahmen der Maturation der Neurone zu einer Verschiebung der Anordnung der Kalziumkanal-Cluster aus den zentralen Anteilen des Wachstumskegels, hin zur Peripherie zu kommen. Dies legt eine wichtige Bedeutung dieser Clusterbildung im Rahmen des Differenzierungsprozesses der Motoneurone nahe (Cohan, Connor et al. 1987, Nishimune, Valdez et al. 2008). Im Falle der spinalen Muskelatrophie konnte eine Differenzierungsstörung der Motoneurone auf Laminin-221 in dieser und mehreren anderen Studien nachgewiesen werden (Jablonka, Schrank et al. 2000, Jablonka, Beck et al. 2007, Ruiz, Casanas et al. 2010, Tejero, Lopez-Manzaneda et al. 2016). Wesentlich für diese Differenzierungssignale ist die Interaktion der LRE-Tripeptidsequenz der Laminine mit β 2-Kette, mit der porenbildenden Einheit der spannungsgabhängigen Kalziumkanäle. Eine Störung dieser Interaktion beeinträchtigt die Ausbildung neuromuskulärer Verbindungen, es

zeigten sich deutlich weniger „aktive Zonen“ (Noakes, Gautam et al. 1995, Rogers and Nishimune 2017).

Die ausbleibenden Differenzierungssignale führen zu mehreren phänotypischen Veränderungen. Unter der Annahme, dass eine gestörte Kalziumhomöostase im Falle der spinalen Muskelatrophie ursächlich oder in großen Anteilen verantwortlich für die gestörte Verarbeitung von Differenzierungssignalen ist, wurden Substanzen gesucht, welche in der Lage sind die lokalen Kalziumströme zu erhöhen. Eine vielversprechende Substanz stellt hierbei der Kalziumkanalagonist R-Roscovitine dar, welcher bereits aufgrund der Inhibition des Zellzyklus als Tumorthérapeutikum in der Erprobung ist (Cicenas, Kalyan et al. 2015). Denn neben der Inhibition verschiedener CDKs wurde für R-Roscovitine auch eine konzentrationsabhängige Beeinflussung des Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanals nachgewiesen. R-Roscovitine hat in niedrigen Konzentrationsbereichen bis etwa 100µM agonistische Wirkung. Dies geschieht im Sinne einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit der Kalziumkanäle (Buraei and Elmslie 2008, Buraei, Liang et al. 2014). Aus diesem Grund ist R-Roscovitine ein potenzieller Kandidat zur Beeinflussung der lokalen Kalziumtransienten. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine phänotypische restitutio des axonalen Längenwachstums durch R-Roscovitine in *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneuronen auf Laminin-221, als Ausdruck einer adäquaten Differenzierung der Motoneurone. In vorhergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe Jablonka, konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von 0,5µM R-Roscovitine keinen Einfluss auf das Überleben der Motoneuronen hat. In Zusammenschau mit der Tatsache, dass die Länge der Kontroll-Motoneurone welche mit R-Roscovitine behandelt nicht different zu solchen ist, welche nur mit BDNF und CNTF behandelt wurden, ist eine toxische Wirkung von R-Roscovitine als Ursache nahezu auszuschließen.

Um die Hypothese der Modulation der Offenwahrscheinlichkeit der Kalziumkanäle als Ursache für die restitutio des Phänotyps der *Smn*^{-/-}; SMN2 Motoneurone zu verifizieren, haben wir Experimente mit dem Gift der Kegelschnecke ω-Conotoxin durchgeführt. ω-Conotoxin blockiert die spannungsabhängigen Kalziumkanäle hochaffin und führt so zu einer Herabsetzung der Kalziumströme und Vesikelfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte (Feldman, Olivera et al. 1987, McCleskey, Fox et al. 1987, Yeager, Yoshikami et al. 1987). Die Affinität des Antagonisten ω-Conotoxin, bezogen auf die Bindung des Kalziumkanals, ist deutlich größer als die von R-Roscovitine. Dies zeigt sich auch in den Experimenten auf

Laminin-221. Die mit ω -Conotoxin behandelten Motoneurone, sowohl die der Kontrolltiere als auch die *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone, zeigen ein deutlich längeres axonales Wachstum. Dies ist Indikator der fehlenden Differenzierung unter diesen Konditionen. Dies gilt auch für die Simultanbehandlung der Motoneurone mit ω -Conotoxin und R-Roscovitine. Hier wird der positive Effekt, der durch die R-Roscovitine Behandlung auftritt, aufgehoben, da die Affinität von ω -Conotoxin für den Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanal höher ist. Auch dies legt nahe, dass die Modulation der Kalziumkanäle durch R-Roscovitine ursächlich für die Verbesserung des Phänotyps ist.

5.2 Führt die Therapie mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine zu einer restitutio der Größe und Organisation des Wachstumskegels?

Aufbauend auf den in Abschnitt 5.1. geschilderten Aspekten der fehlenden Differenzierungssignale, konnte neben der restitutio der Axonlängen gezeigt werden, dass R-Roscovitine auch in der Lage ist, die Größe des Wachstumskegels im Falle der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone an das Niveau der Kontrolltiere anzugleichen (Abb. 8 bis 10). Auch führte die Behandlung der Motoneurone im Falle der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone zu einer Normalisierung der Intensitäten von β -Aktin und des Ca_v2.2-N-Typ-Kalziumkanals in Wachstumskegeln fünf Tage kultivierter Motoneurone. Die Intensität ist in diesem Falle als Ausdruck der Menge an vorliegendem Protein zu verstehen. Dies bedeutet, dass durch die Therapie mit R-Roscovitine die Integrität der Wachstumskegel in vitro an die der Kontrolltiere angeglichen werden kann. In weiterführenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Roscovitine auch in der Lage ist die lokalen, spontanen Kalziumströme zu normalisieren (Tejero, Balk et al. 2020). Zusammenfassend ergibt sich also das Bild, dass R-Roscovitine in der Lage ist, die gestörte Differenzierung der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone auf Laminin-221 in vitro zu normalisieren. Die Motoneurone entwickeln sich unter der Therapie mit R-Roscovitine im Beobachtungszeitraum in vitro analog zu denen der Kontrolltiere. Limitierend ist hier, dass die alleinige Normalisierung der Menge an Protein noch keine Aussage über die Funktionalität des terminalen Axons in vivo erlaubt.

5.3 Lässt sich durch die pränatale Applikation von R-Roscovitine in ein trächtiges Muttertier eine nutzbringende Wirkung bei Smn-defizienten Nachkommen erzielen?

Es handelt sich im Falle der SMA, um eine progredient fortschreitende, neurodegenerative Erkrankung. Insbesondere im Falle der spinalen Muskelatrophie Typ I werden die betroffenen Individuen bereits symptomatisch geboren (Russman 2007). Unter Berücksichtigung dieser Annahme ist es logisch, dass wesentliche Alterationen sich bereits in der Embryonalphase entwickeln. Unter Berücksichtigung dieser pathophysiologischen Grundlagen der spinalen Muskelatrophie wurde die Idee geboren, bereits intrauterin, durch Applikation von R-Roscovitine in ein trächtiges Tier, mit der Therapie der betroffenen Individuen zu beginnen. Die Tatsache, dass diese pränatale Applikation der trächtigen Muttertiere zu einer phänotypischen Restitutio führt, legt nahe, dass R-Roscovitine bereits in diesem Stadium in der Lage ist die gestörte Kalziumhomöostase im Bereich der motorischen Endplatten signifikant zu verbessern. Dies hat eine deutlich verbesserte Differenzierung der Motoneurone *in vitro* auf Laminin-221 zur Folge (Abb.14 I) und II)). Die in der Folge durchgeführten Überlebensanalysen von pränatal behandelten Mutanten, zeigen einen deutlichen Überlebensvorteil der Tiere im Vergleich zu den unbehandelten, betroffenen Tieren (Tejero, Balk et al. 2020). Darüber hinaus spielt eine möglicherweise verbesserte Wirkung von R-Roscovitine in embryonalen Entwicklungsstadien, aufgrund der beschriebenen verminderten Leistungsfähigkeit der CypP450-abhängigen Enzyme und der deutlich höheren Passage über die Blut-Hirn-Schranke, eine Rolle in Überlegungen des geeigneten Zeitpunktes für eine Therapie mit R-Roscovitine (Kearns, Abdel-Rahman et al. 2003). Gleichwohl ergibt sich neben der wissenschaftlichen Fragestellung nach dem adäquaten Therapiezeitpunkt auch eine ethische Fragestellung. Um eine pränatale Therapie beginnen zu können, muss die Diagnose der spinalen Muskelatrophie bereits früh intrauterin gestellt werden. Dies wirft die Frage nach einer Ausweitung pränataler Diagnostik auf, was unter anderem zu großen Konflikten im Umgang mit einem positiven Testergebnis führen kann. Fraglich ist auch wie aggressiv man die Eltern der betroffenen Kinder hinsichtlich der Notwendigkeit einer Therapie beraten sollte. Es fehlen hier Ergebnisse klinischer Anwendungsstudien, um die Sinnhaftigkeit dieser Maßnahmen zu untersuchen.

5.4 Ist der positive Effekt von R-Roscovitine isoliert durch einen Agonismus am spannungsabhängigen Kalziumkanal bedingt oder spielt die Modulation der Cyclin dependent kinase 5 (CDK5) ebenfalls eine Rolle?

Die Möglichkeiten der Einflussnahme von R-Roscovitine auf die Maturation bzw. Differenzierung von Motoneuronen sind vielfältig. Betrachtet man erneut die Pathophysiologie der neurodegenerativen Erkrankung SMA, ist der positive Effekt von R-Roscovitine am Wahrscheinlichsten durch eine Modulation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen oder durch eine Inhibition der CDK 5 zu erklären. Auch ist es denkbar, dass beide Effekte im Rahmen der Therapie der spinalen Muskelatrophie synergistisch eine Rolle spielen.

R-Roscovitine als Agonist an N-Typ-Kalziumkanälen

Kalziumkanäle spielen, wie bereits in Kapitel 1.4.1. dargelegt, eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen innerhalb eines Neurons (Gu, Olson et al. 1994, Gu and Spitzer 1995). Kalziumkanäle sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut (Abb.4). Eine zentrale Rolle spielt hierbei die porenbildende $\alpha 1$ -Untereinheit. Sie setzt sich aus insgesamt vier transmembranen Untereinheiten, mit je sechs transmembranen Helices zusammen (Gurkoff, Shahlaie et al. 2013). Prinzipiell unterscheidet man verschiedene offene bzw. geschlossene Zustände spannungsabhängiger Kanäle. Im Wesentlichen sind dies der offene Zustand, Zustand der Inaktivierung, der geschlossene Zustand und Zustand der Aktivierung. Prinzipiell ist es möglich, über verschiedene Mechanismen spannungsabhängige Kanäle in jedem Zustand zu beeinflussen (Lee and Elmslie 1999). In diesem Verständnis ergeben sich mehrere Optionen einer Beeinflussung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle. Agonisten im Allgemeinen erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals. Dies ist über die Verlängerung des Offenzustandes, die Verlangsamung der Inaktivierung oder Beschleunigung der Aktivierung möglich. Für Antagonisten gilt dies vice versa. Für R-Roscovitine wurden komplexe Mechanismen sowohl an P/Q-Typ-Kalziumkanälen, als auch an N-Typ-Kalziumkanälen beschrieben. Erste Untersuchungen erfolgten für die agonistische Wirkung von R-Roscovitine an P/Q-Typ-Kalziumkanälen (Yan, Chi et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Roscovitine die Inaktivierung der spannungsabhängigen Kanäle verlangsamt und somit die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle erhöht. In Folgearbeiten der

Arbeitsgruppe um Buraei konnte gezeigt werden, dass dies nicht nur für P/Q-Typ-Kalziumkanäle, sondern auch für N-Typ-Kalziumkanäle gilt (Buraei, Angheliescu et al. 2005). Dies konnte im Verlauf durch Einzelkanalableitungen bestätigt werden (DeStefino, Pilato et al. 2010). Diese gesteigerte Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle führt zu einem gesteigerten Kalziumeinstrom in die Zelle. Dies hat konsekutiv eine lokal erhöhte Freisetzung von Vesikeln zur Folge. In Untersuchungen an neuromuskulären Endplatten des Rana Frosches wurde eine Erhöhung der Endplattenpotenziale um etwa 125% beschrieben. In annähernd linearem Verhältnis hierzu wurde ein Anstieg der Acetylcholinfreisetzung um 149% beschrieben (Cho and Meriney 2006). Die Beeinflussung der Kalziumkanäle durch Roscovitine tritt rasch ein und ist konzentrationsabhängig. Insbesondere die eingesetzte Konzentration von R-Roscovitine spielt eine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung von Kalziumkanälen. Einerseits verzögert R-Roscovitine die Inaktivierung der Kanäle innerhalb von etwa 2s nach Applikation, andererseits tritt, je nach eingesetzter Konzentration, aber nach einigen Minuten im Falle von höheren Konzentrationen auch eine antagonistische Wirkung am Kanal auf. Die Konzentrationsabhängigkeit ist in Tabelle 8 genauer dargestellt (Buraei and Elmslie 2008).

Substanz	Cav2.2 Agonismus (EC ₅₀ μM)	Cav2.2 Antagonismus (IC ₅₀ μM)
R-Roscovitine	28	130
S-Roscovitine	565	219

Tabelle 8: Konzentrationsabhängige Beeinflussung des Cav2.2-N-Typ-Kalziumkanals durch R-Roscovitine und S-Roscovitine

Dargestellt ist der konzentrationsabhängige Unterschied zwischen agonistischer und antagonistischer Wirkung von R- und S-Roscovitine am Cav2.2-N-Typ-Kalziumkanal. Der agonistische Effekt von S-Roscovitine tritt erst bei deutlich höheren Konzentrationen ein. Daher ist dieser Effekt in der Modulation der Kalziumkanäle in den hier eingesetzten Konzentrationsbereichen nicht von Bedeutung. Die EC₅₀ als mittlere effektive Dosis und IC₅₀ als mittlere inhibitorische Konzentration sind Referenzwerte zur Beurteilung einer möglichen agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung einer Substanz.

Aufgrund der potenten Inhibition zahlreicher CDKs ist es von Bedeutung, den Effekt der direkten kurzfristigen Modulation der Kalziumkanäle von einem indirekten Einfluss durch die Inhibition von vor allem CDK 5 auf die Kalziumströme abzugrenzen. Es gibt einige Hinweise, dass bezogen auf die Beeinflussung der Kalziumkanäle eine unmittelbare Modulation durch R-Roscovitine entscheidend ist. Für diese Hypothese spricht, dass der Effekt von R-Roscovitine bezogen auf die Modulation der Kalziumkanäle, auch gemessen an der Steigerung der Endplattenpotenziale und der

Freisetzung synaptischer Vesikel, innerhalb von <2 s Eintritt. Dies macht eine Modulation über die CDK 5 abhängige Phosphorylierung von Kalziumkanälen unwahrscheinlich. Auch in Kalzium Imaging Untersuchungen von isolierten Motoneuronen durch Jablonka und Tejero et.al konnte ein nahezu sofort einsetzender Effekt von R-Roscovitine nachgewiesen werden, sodass eine direkte Modulation der Kalziumkanäle wahrscheinlich ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit dem Einsatz von ω -Conotoxin widersprechen diesen Daten nicht, können aber aufgrund der Dauer der Applikation von fünf bzw. sieben Tagen in vitro, die Hypothese einer direkten Modulation der Kalziumkanäle auch nicht zweifelsfrei belegen. Interessanterweise unterscheiden sich die Eigenschaften, bezogen auf die Modulation von Kalziumkanälen, deutlich zwischen den beiden Enantiomeren R-Roscovitine und S-Roscovitine (Buraei, Schofield et al. 2007). Wie in Tabelle 8 dargestellt, unterscheiden sie sich vor allem bezüglich ihrer EC_{50} -Konzentration, sowie auch der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50} . Die benötigte Konzentration an S-Roscovitine für eine agonistische Wirkung am $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal, liegt um den Faktor 20,1 höher als es bei R-Roscovitine der Fall ist. Weiterhin liegt die IC_{50} von S-Roscovitine für den Antagonismus am $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal unter der für den Agonismus. Die IC_{50} bezogen auf die Inhibition der CDK 5 (sowie 1 und 2) liegt deutlich unterhalb der EC_{50} -Konzentrationen beider Substanzen für den Agonismus am $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal. Für R-Roscovitine liegt die IC_{50} für CDK 5 beispielsweise bei $0,16 - 0,7 \mu M$, ist aber stark von der energetischen Situation der Zelle abhängig (Knockaert and Meijer 2002). Wählt man also, wie in unserem Experiment der Fall, die Konzentrationen der eingesetzten Enantiomere R- und S-Roscovitine so, dass zwar R-Roscovitine agonistisch am $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal wirkt, S-Roscovitine aufgrund der deutlich höheren EC_{50} jedoch in der eingesetzten Konzentration weder agonistische noch antagonistische Effekte am $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal zeigt, ist es möglich den Effekt der Inhibition der CDKs von der Modulation der Kalziumkanäle abzugrenzen. Der Einfluss auf die Inhibition, insbesondere von CDK 5, unterscheidet sich nicht wesentlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass S-Roscovitine auf Laminin-221 nicht in der Lage ist, den Phänotyp der *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone bezogen auf die Axonlängen zu normalisieren (Abb. 6, 7, 11 und 12). In derselben Kultur konnten die Effekte von R-Roscovitine auf den Einfluss des axonalen Längenwachstums nochmals bestätigt werden, sodass von adäquaten Kulturbedingungen ausgegangen wird. Dies spricht stark für einen relevanten Effekt

der $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanal Modulation durch R-Roscovitine. Weiterhin spricht für diese Theorie, dass intrazellulär appliziertes R-Roscovitine zu keiner direkten Änderung der Kalziumtransienten, wie sie bei der externen Applikation zu sehen ist, führt (Buraei, Anghelescu et al. 2005, Cho and Meriney 2006, DeStefino, Pilato et al. 2010). Die Änderung der Kalziumtransienten bei intrazellulärer Applikation tritt deutlich später ein und ist von der Inhibition der CDK 5 abhängig. Diese wird wiederum vom p35-Protein reguliert (Lopes and Agostinho 2011). Ein knock-out des p35-Proteins führt zu einem nahezu vollständigen Rückgang der Aktivität der CDK 5 (Chae, Kwon et al. 1997). Die extrazelluläre Applikation von R-Roscovitine führt jedoch auch in diesem Modell zu einer Erhöhung der lokalen Kalziumtransienten innerhalb von Sekunden (Yan, Chi et al. 2002). Diese Tatsache macht ebenfalls eine direkte Beeinflussung des $Ca_v2.2$ -N-Typ-Kalziumkanals wahrscheinlich.

R-Roscovitine als Inhibitor der CDK5

Die Familie der Cyclin-abhängigen-Kinasen umfasst mittlerweile mindestens 20 verschiedene Proteine. Es sind insgesamt kleine Moleküle mit einem Gewicht zwischen 30 und etwa 40kDa. Im Wesentlichen handelt es sich bei dieser Gruppe von Kinasen um Serin/Threonin-Kinasen (Morgan 1997, Lopes and Agostinho 2011). Die Funktionen der einzelnen Kinasen sind mannigfaltig. Die meisten von ihnen spielen eine entscheidende bei der Regulation des Zellzyklus. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass eine Dysregulation von Cyclin-abhängigen-Kinasen in proliferierenden Zellen mit einer unkontrollierten Teilung einhergehen kann, was letztlich zur Tumorbildung führen kann (Tannoch, Hinds et al. 2000).

Der Name leitet sich aus der Tatsache ab, dass eine Aktivierung des Komplexes von der Interaktion mit regulatorischen Untereinheiten, den sogenannten Cyclinen, abhängt (Nguyen, Mushynski et al. 2002, Lopes and Agostinho 2011).

Unter den Cyclin-abhängigen-Kinasen nimmt CDK 5 bezogen auf das Nervensystem eine besondere Rolle ein. Interessanterweise hat CDK 5, im Gegensatz zu den anderen CDKs, nur eine indirekte Kontrolle über den Zellzyklus und die Aktivierung läuft hier über Regulatorproteine. Dies sind im Wesentlichen die vor allem in Neuronen vorkommenden Regulatorproteine p35 und p39, welche den Cyclinen zwar ähneln, aber sich in der molekularen Struktur unterscheiden (Tsai, Delalle et al. 1994, Dhavan and Tsai 2001, Lopes and Agostinho 2011). Die Regulatorproteine p35 und p39 konnten in mehreren Studien in unterschiedlichen Lokalisationen in neuronalem

Gewebe nachgewiesen werden. Hierzu zählt auch das Areal des Wachstumskegels (Paglini, Pigino et al. 1998). Die Beeinflussung des Komplexes aus p35(p39) /CDK 5 ist vielfältig und abhängig von der Phosphorylierung von CDK 5 selbst, sowie aber auch der Phosphorylierung der Regulatorproteine. Zur Beurteilung der Aktivität von CDK 5/p35 spielt auch die Lokalisation der Proteine eine Rolle. Die letzten Studien zeigen, dass der Komplex entweder membranständig oder zytoplasmatisch vorliegen kann. Die zytoplasmatische Form ist nach letzten Erkenntnissen die aktive Form (Sato, Zhu et al. 2007, Yamada, Saito et al. 2007, Lopes and Agostinho 2011).

Die einzelnen Funktionen des CDK 5 Komplexes sind unter anderem die Beeinflussung der Differenzierung des Wachstumskegels mit Ausbildung von Synapsen, die Beeinflussung des Auswachsens der Axone, sowie generell Zellmaturation und Überleben (Lopes and Agostinho 2011). Auf diese soll im Folgenden weiter eingegangen werden.

Die herausragende Rolle von CDK 5 für die Maturation des zentralen Nervensystems wird durch die Untersuchung von CDK 5-knock-out Tieren deutlich. Diese Tiere sind nicht überlebensfähig und sterben in der Regel intrauterin oder direkt nach der Geburt. Histologische Untersuchungen zeigen, dass diese Tiere eine Störung der Organisation vieler Areale des zentralen Nervensystems aufweisen. Gleiches gilt für Untersuchungen an p35^{-/-}-Tieren (Goodnough, Price et al. 1994, Chae, Kwon et al. 1997, Kwon, Tsai et al. 1999, Jessberger, Aigner et al. 2008). CDK 5 übernimmt also eine wichtige Rolle im Rahmen der Interaktion kortikaler Neurone. Auch das Auswachsen der Dendriten und Axone scheint bis zu einem gewissen Grad von CDK 5 bzw. dem aktiven CDK 5/p35 Komplex reguliert zu werden. Aber nicht nur das Auswachsen der Axone, sondern auch die Ausbildung funktionierender Zell-Zell-Schnittstellen, wie Synapsen, ist abhängig von der Aktivität des CDK 5/p35-Komplexes (Kwon, Tsai et al. 1999, Cheung and Ip 2007). Bezogen auf Motoneurone scheint es so zu sein, dass CDK 5/p35, bis zu einem gewissen Grad, Einfluss auf die Acetylcholinfreisetzung nimmt. Studien konnten eine Kolo-kalisation des Rezeptors mit dem Komplex CDK 5/p35 an der neuromuskulären Endplatte zeigen. Ähnliche Daten liegen auch zum glutamatergen System vor (Fu, Fu et al. 2001, Fu, Ip et al. 2005, Lopes and Agostinho 2011).

CDK 5 ist insofern ein hochinteressanter Modulator neuronaler Zellen, als dass diese Kinase eine Zwitterfunktion einnimmt. Zum einen ist sie von enormer Bedeutung für das Zellüberleben. Zum anderen spielt sie aber auch eine entscheidende Rolle bei der

Degeneration von Zellen bis hin zu Apoptose. Neben den obenstehenden Funktionen im Rahmen der Maturation von Zellen, spielt der Komplex CDK 5/p35 auch eine wichtige Rolle im Falle der Verarbeitung von Stress, zum Beispiel im Sinne von oxidativem Stress, wo einige Arbeiten zeigen konnten, dass die DNA-Reparatur durch den Komplex positiv beeinflusst wird (Li, Zhang et al. 2002, Vartiainen, Keksa-Goldsteine et al. 2002, Hisanaga and Endo 2010).

Gleichzeitig scheint der CDK 5/p35-Komplex unter bestimmten Bedingungen inhibitorisch auf pro-apoptische Signalwege zu wirken, wie den c-Jun-N-Terminal-3-Kinase (JNK3) -Signalweg, welcher vor allem eine Rolle bei negativem Stress spielt. Gleichzeitig fördert er zusätzlich Signalwege, die das Zellüberleben sichern, wie zum Beispiel den PI3K/Akt-Signalweg (Hisanaga and Endo 2010).

CDK 5 spielt allerdings auch eine entscheidende Rolle im Rahmen neurodegenerativer Prozesse und beim Untergang von Neuronen. Ein wesentlicher Faktor für die Vermittlung des Untergangs von Neuronen ist die Dysregulation der Regulatorproteine p35 und p39, welche für eine korrekte Funktion von CDK 5 essentiell sind. Grundlage dieser veränderten CDK 5-Aktivität, ist die Spaltung von p35 zu p25 (p39/p29), einer trunkeierten Version der originären Proteine. Dies geschieht durch Calpaine (Camins, Verdaguer et al. 2006, Hisanaga and Endo 2010, Lopes and Agostinho 2011). Calpaine spielen im Rahmen mehrerer intrazellulärer Prozesse eine entscheidende Rolle. Sie sind unter anderem essentiell für die synaptische Plastizität und somit auch für Lernprozesse (Angelo, Plattner et al. 2006, Liu, Liu et al. 2008, Liu, Xing et al. 2008, Xue, Li et al. 2008). Untersuchungen an p25-transgenen Mäusen konnten diese Erkenntnisse bestätigen. Die Tiere mit einer vermehrten p25-Aktivität zeigten einen Verlust von kortikalen und hippokampalen Neuronen (Cruz, Tseng et al. 2003, Noble, Olm et al. 2003). Ursächlich für die Spaltung von p35 zu p25 (p39/p29) scheint eine Störung der Kalziumhomöostase zu sein. Dabei scheint vor allem ein lokaler Kalziumüberschuss, zum Beispiel durch eine Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum aufgrund äußerer Stressoren, eine entscheidende Rolle zu spielen (Araujo, Carreira et al. 2010, Lopes and Agostinho 2011).

Grundlage der Degeneration von Neuronen ist, dass der alterierte CDK 5/p25-Komplex in den Nukleus gelangt und hier zahlreiche Proteine phosphoryliert, die regulatorische Funktion für den Zellzyklus übernehmen, Reparaturmechanismen beeinflussen oder als Überlebensfaktoren fungieren. Dies führt im Falle der postmitotischen Neurone in letzter Konsequenz zum Absterben der Neurone (Hisanaga and Endo 2010).

CDK 5 spielt also im Falle zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die gestörte Aktivität von CDK 5 führt auch zur Aggregation von Amyloid- β und scheint somit ebenfalls eine Rolle bei der Alzheimer Krankheit zu spielen. Veränderte Aktivitäten der CDK 5 scheinen auch bei Prion-Erkrankungen, der amyotrophen Lateralsklerose oder Parkinson relevant zu sein (Lopes, Oliveira et al. 2009, Lopes, Oliveira et al. 2010, Lopes and Agostinho 2011). Im Falle der spinalen Muskelatrophie wurde, zuletzt durch die Arbeitsgruppe Miller und Kollegen, ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des Zytoskelettproteins Tau durch CDK 5 und der Degeneration der Motoneurone postuliert (Miller, Feng et al. 2015). Tau ist ein Protein welches mit Mikrotubuli assoziiert ist und eine entscheidende Rolle beim Transport, zum Beispiel von mRNA, entlang des Axons spielt. Darüber hinaus beeinflusst es das Auswachsen der Neurite im Rahmen der Knüpfung von Zell-Zell-Verbindungen (Weingarten, Lockwood et al. 1975, Iqbal, Alonso Adel et al. 2005, Morris, Maeda et al. 2011). Die Aktivität von Tau wird durch Phosphorylierung reguliert. Auch der CDK 5/p35-Komplex ist in der Lage Tau zu phosphorylieren und im Falle der physiologischen Aktivität des Komplexes, so die Aktivität zu beeinflussen und einen gerichteten axonalen Transport zu ermöglichen (Tatebayashi, Haque et al. 2004, Miller, Feng et al. 2015). Ein gut beschriebener Mechanismus ist die Aggregation von phosphoryliertem Tau im Falle der sogenannten Tauopathien und der Alzheimer Erkrankung. Tau spielt als Ziel des CDK 5/p35-Komplexes insofern eine besondere Rolle, als dass das Tau-Protein viele Serin- und Threoninanteile besitzt, welche durch die Serin-/Threoninkinase CDK 5 phosphoryliert werden können (Shahani and Brandt 2002). Die besondere Rolle von CDK 5 wurde in Untersuchungen mit transgenen Tieren, welche p25 in hoher Menge exprimieren, dargestellt. Hier zeigte sich eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und Aggregation eben dieser alterierten Tau-Proteine, mit der Folge der Neurodegeneration (Cruz, Tseng et al. 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Kinaseaktivität von CDK 5 oder eine Verringerung des Abbaus von p35 zu p25 in vitro zu einer Verringerung der Hyperphosphorylierung und Aggregation der Tau-Proteine im Modell für Prion-Erkrankungen und für die Alzheimer Erkrankung führt (Ade-Biassette, Verney et al. 2006, Lopes, Oliveira et al. 2009, Lopes, Oliveira et al. 2010, Lopes and Agostinho 2011)

Im Falle der spinalen Muskelatrophie scheint die Situation etwas anders zu sein. Die Arbeitsgruppe um Miller und Kollegen konnte zwar einen erhöhte

Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins im Falle der spinalen Muskelatrophie nachvollziehen, die für andere neurodegenerativen Erkrankungen typischen Tau-Aggregate konnten jedoch nicht beobachtet werden (Miller, Feng et al. 2015). Detaillierte Untersuchungen fehlen hier zurzeit noch.

In dieser Arbeit konnte zumindest gezeigt werden, dass die absolute Menge an CDK 5 in kultivierten Motoneuronen im Falle der SMA nicht alteriert ist (Abb.13). Die hier durchgeführte Methode ist allerdings nicht in der Lage zu beurteilen, inwieweit der Phosphorylierungsstatus von CDK 5 alteriert ist oder in welchen Anteilen CDK 5 möglicherweise im CDK 5/p25-Komplex vorliegt. Die Tatsache, dass R-Roscovitine zu einer Restitutio des Phänotyps führt, der in dem hier eingesetzten Konzentrationsbereich alleinige CDK 5-Antagonist S-Roscovitine jedoch nicht, legt ebenfalls nahe, dass vor allem eine akute Beeinflussung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle relevant für diese Verbesserung ist. Ob und wie weit die Inhibition der Cyclin-abhängigen-Kinase allerdings im langfristigen Verlauf eine Rolle spielt, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5.5 Roscovitine als Therapeutikum – aktueller Einsatz und möglicher Einsatz in der spinalen Muskelatrophie

Wie bereits in Abschnitt 1.3 dargelegt muss man zwischen kausalen und symptomatischen Ansätzen in der Therapie der SMA unterscheiden.

Im Gegensatz zu den überwiegend kausalen Therapieansätzen, ist der positive Effekt von R-Roscovitine eher durch die Adressierung von Folgeproblemen des Mangels an SMN-Protein zu erklären. Die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Jablonka konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Menge an SMN-Protein durch die Therapie mit R-Roscovitine nicht beeinflusst wird (Tejero, Balk et al. 2020). Ein möglicher Vorteil der R-Roscovitine-Therapie ist, dass das Medikament bereits als Zellzyklus-Inhibitor in der Therapie von Tumoren in klinischen Studien untersucht wird. Der handelsübliche Name ist Selicilib, bzw. CYC202. Dies bedeutet auch, dass bereits wesentliche Erkenntnisse zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik vorliegen. Zusätzlich liegen Erfahrungsberichte möglicher unerwünschter Effekte vor.

Pharmakokinetik und -dynamik

Aus der gastrointestinalen Resorption nach oraler Applikation resultiert eine relativ gute Bioverfügbarkeit, allerdings mit einer relativ langen Resorptionsphase im Gastrointestinaltrakt. Die Bioverfügbarkeit ist in den einzelnen Studien zum Teil unterschiedlich beziffert, scheint aber mit über 90% sehr gut zu sein. Ähnlich wie andere Medikamente mit hydrophober Molekularstruktur kumuliert R-Roscovitine im Fettgewebe (Meijer and Raymond 2003, de la Motte and Gianella-Borradori 2004, Vita, Abdel-Rehim et al. 2005, Vita, Abdel-Rehim et al. 2005, Vita, Skansen et al. 2005). Die Halbwertszeit von R-Roscovitine divergiert konzentrationsabhängig und kann bis zu fünf Stunden betragen. Die Passage der Blut-Hirn-Schranke ist ebenfalls konzentrationsabhängig variabel. In gängigen Konzentrationen liegt sie beim Erwachsenen um 30%. Der Abbau des Medikamentes geschieht über einen biphasischen Mechanismus, der non-linear abläuft und Cytochrom P 450-abhängig ist (Vita, Abdel-Rehim et al. 2005). Die Metabolite sind wasserlöslich und werden im Wesentlichen renal eliminiert (de la Motte and Gianella-Borradori 2004, Vita, Abdel-Rehim et al. 2005). Es ist jedoch hinlänglich bekannt, dass die Blut-Hirn-Schranke insbesondere im Falle von sich entwickelnden Individuen im Embryonalstadium, wesentlich durchlässiger ist. Auch die CypP450-abhängigen Enzyme sind deutlich weniger leistungsfähig, sodass davon ausgegangen wird, dass R-Roscovitine in diesen Stadien eine deutlich höhere Passage über die Blut-Hirn-Schranke aufweist (Kearns, Abdel-Rahman et al. 2003). Die notwendige Plasmakonzentration liegt zwischen 5 und 20µM. Um diese Konzentrationen wurden in den Studien zwischen 200 bis 500 mg R-Roscovitine pro Tag oral appliziert (Meijer and Raymond 2003).

Präklinische und klinische Studien bis dato

R-Roscovitine ist ein potenter Inhibitor des Zellzyklus. Daher befassen sich die vorhandenen präklinischen und klinischen Studien überwiegend mit dem Einsatz von R-Roscovitine im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorerkrankungen. Der Einsatz von R-Roscovitine wurde in präklinischen Tests an unterschiedlichen Tumorzelllinien erprobt. Stark vereinfacht kann man die beobachteten Effekte auf zwei Mechanismen herunterbrechen. Zum einen die Inhibition des Zellzyklus in der G0-, G1-, S- oder G2/M- Phase und zum anderen eine pro apoptotische Wirkung in den Tumorzellen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen umfassen die Beeinflussung des Ras-MAPK, NF-κB, p53 und des JAK-STAT-Signalweges (McClue,

Blake et al. 2002, Whittaker, Te Poele et al. 2007, Dey, Wong et al. 2008, Paprskarova, Krystof et al. 2009, Cicenas, Kalyan et al. 2015). Interessanterweise wurden auch synergistische Effekte mit anderen Zytostatika bzw. Medikamenten aus der Tumortherapie beschrieben. Hierzu zählen unter anderem Doxorubicin, Taxole, Vinblastin, Tamoxifen und es sind auch synergistische Effekte im Falle der Kombination R-Roscovitine mit strahlentherapeutischen Maßnahmen beschrieben (Maggiorella, Deutsch et al. 2003, Abaza, Bahman et al. 2008, Lambert, Qiao et al. 2008).

Am besten untersucht ist aktuell der Einsatz im Falle von Adenokarzinomen, B-Zell-Malignomen und der kombinierte Einsatz von R-Roscovitine und Capecitabin im Falle von Brustkrebserkrankungen wo es zu einer Verbesserung des Überlebens führte (Fischer and Gianella-Borradori 2005, Le Tourneau, Faivre et al. 2010, Cicenas, Kalyan et al. 2015).

R-Roscovitine ist aber auch Gegenstand der Untersuchung als potenzielles Therapeutikum anderer Erkrankungen. Besonders viele Untersuchungen liegen zum Einsatz von R-Roscovitine im Falle von Nierenerkrankungen vor. Hier werden insbesondere Tiermodelle für polyzystische Nierenerkrankungen, aber auch Modelle für diverse Glomerulonephritiden untersucht. Es zeigen sich vielversprechende Ergebnisse, insbesondere bezogen auf eine restitutio bzw. einen Erhalt der Nierenfunktion und eine reduzierte mesangiozelluläre Proliferation (Bukanov, Smith et al. 2006, Smith, Bukanov et al. 2006).

Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen zur Schmerzreduktion durch R-Roscovitine im Falle von Patienten mit ossären Malignomen. Hier scheint die Modulation des glutamatergen Systems und vor allem des NMDA-Rezeptors bei intrathekaler Gabe eine Rolle zu spielen (Zhang, Liu et al. 2012).

R- und S-Roscovitine werden bezüglich möglicher neuroprotektiver Eigenschaften nach apoplektischen Insulten untersucht (Rousselet, Letondor et al. 2018). Auch im Falle von HIV-positiven Individuen wurde R-Roscovitine als potenzielles Therapeutikum untersucht. Gegenstand dieser Untersuchungen sind vor allem die neurodegenerativen Komponenten des Virus (z.B. HIV-Enzephalitiden). Einige Studien postulieren eine erhöhte CDK 5-Expression im Falle der HIV-Enzephalitis (Schang, Bantly et al. 2002, Schang 2004, Patrick, Crews et al. 2011).

Die häufigsten in den klinischen Phase I und II Studien berichteten adversen Effekte waren Fatigue, eine Erhöhung der Transaminasen oder gastrointestinale

Nebenwirkungen. Diese waren allerdings stark konzentrationsabhängig und traten vor allem im Falle von hohen Dosierungen auf (Le Tourneau, Faivre et al. 2010, Cicenás, Kalyan et al. 2015).

Roscovitine im Falle von spinaler Muskelatrophie

Aufgrund des fatalen Verlaufs der SMA wird vor allem im Bereich der kausalen Therapiestrategien mit Hochdruck geforscht. Eine aktuell vielversprechende Substanz ist das 2017 zugelassene Oligonukleotid Nusinersen (Spinraza®). Darüber hinaus gibt es vielversprechende Untersuchungen mit dem Wirkstoff Risdiplam, welcher dem Nusinersen ähnelt (Ratni, Karp et al. 2016). Die Wirkung gründet auf einer Modifikation des Spleißvorgangs von Exon 7, was zu einer Erhöhung der Menge an funktionellem SMN-Protein führt (Hua, Vickers et al. 2008, Naryshkin, Weetall et al. 2014, Sivaramakrishnan, McCarthy et al. 2017). Risdiplam kann oral appliziert werden. Aufgrund positiver in vitro Untersuchungen laufen aktuell klinische Studien. Erste Analysen machen eine Zulassung durch die FDA wahrscheinlich (Poirier, Weetall et al. 2018, Sturm, Gunther et al. 2019). Darüber hinaus befinden sich Substanzen aus dem gentherapeutischen Bereich in der Erprobung. Basis ist die lentivirale Transmission des SMN1 Gens in die Zellen von SMA Typ 1 Patienten. Mittlerweile wurde das Medikament Zolgensma durch die FDA für die Therapie von Kindern mit SMA unter 2 Jahren zugelassen. Prinzip ist hier, dass das SMN1-Gen über einen AAV9 Vektor direkt in die α -Motoneurone gelangt.

Neben diesen bereits zugelassenen kausalen Therapieoptionen und in Kenntnis, dass sich vielversprechende Substanzen zur Therapie der SMA aktuell in klinischen Studien befinden, stellt sich die Frage welche Rolle R-Roscovitine in der Therapie der SMA einnimmt. Klar ist, dass R-Roscovitine nicht in der Lage ist, die Menge an SMN-Protein zu erhöhen (Tejero, Balk et al. 2020). Fakt ist aber auch, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nahe legen, dass R-Roscovitine in der Lage ist für einen gewissen Zeitraum den Phänotyp in vitro kultivierter Neurone, aber auch das Überleben von Mäusen mit einer SMA Typ 1 äquivalenten Verlaufsform in vivo positiv zu beeinflussen (Tejero, Balk et al. 2020). Die hier erhobenen Daten legen in Verbindung mit den Kalzium Imaging Analysen der Arbeitsgruppe von Frau PD. Dr. Jablonka nahe, dass der Effekt von R-Roscovitine sehr schnell Eintritt. Dies ist der entscheidende Vorteil gegenüber den kausalen Therapieansätzen. Die Therapie mit R-Roscovitine stellt somit eine Option dar, die kausalen Therapiestrategien über einen gewissen Zeitraum zu unterstützen.

Es hat seine Bedeutung also am ehesten als Supportivtherapeutikum kombiniert mit kausalen Therapeutika, gegebenenfalls auch im Sinne einer überbrückenden Therapie bis zum Anschlagen kausaler Medikamente.

5.6 Limitationen

Es handelt sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen überwiegend um Analysen von in vitro kultivierten Motoneuronen. In Konsistenz mit der Tatsache, dass bereits frühere Ergebnisse, vor allem im Einsatz von neurotrophen Faktoren, nicht ohne Weiteres auf die in vivo Situation zu extra polieren waren, sind weitere in vivo Analysen essentiell. Erste auf dieser Arbeit aufbauenden Daten zeigten bereits einen positiven Effekt von R-Roscovitine auf das Überleben der Tiere eines murinen Mausmodells.

Ein weiterer limitierender Faktor ist die Tatsache, dass mit den hier durchgeführten Methoden eine Beeinflussung der Neurodegeneration durch CDK 5 nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Die von Frau PD. Dr. Jablonka kürzlich veröffentlichten Untersuchungen an Motoneuronen von CDK 5-knock-out Tieren zeigten jedoch weiterhin einen positiven Einfluss von R-Roscovitine auf die Entwicklung von *Smn*^{-/-}; SMN2-Motoneurone. Allerdings fehlen auch hier noch in vivo Analysen (Tejero, Balk et al. 2020).

6. Zusammenfassung

Die spinale Muskelatrophie ist nach der zystischen Fibrose die zweithäufigste Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang und Todesfolge bei Kindern. Der Mangel an intaktem SMN-Protein führt zu einer retrograden Degeneration der Motoneurone. Je nach prozentualem Mangel des SMN-Proteins ergeben sich unterschiedliche Verlaufsformen. Im Falle der schwersten Form liegt die Lebenserwartung unter zwei Jahren für Neugeborene. Die genaue Ursache der spinalen Muskelatrophie ist nicht abschließend geklärt. Klar ist jedoch, dass eine Differenzierungsdefekt an der muskulären Endplatte der Motoneurone vorliegt. In Zusammenschau der hier generierten Ergebnisse und zahlreicher Vorarbeiten zeigt sich, dass eine gestörte Kalziumhomöostase mitverantwortlich für diese Differenzierungsstörung ist. Dies ist am ehesten durch gestörte lokale Kalziumtransienten und eine veränderte Mikrostruktur der Endplatte, im Sinne des Fehlens der für die Differenzierung essentiellen Kalziumkanal-Cluster, zu erklären. Auch wenn die Wiederherstellung der Kalziumhomöostase keinen Einfluss auf die Menge an vorhandenem SMN-Protein hat, zeigt der Einsatz des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine eine restitutio des Phänotyps kultivierter Motoneurone in vitro, sowie auch eine signifikante Lebensverlängerung von murinen Tieren mit einer der SMA I äquivalenten Verlaufsform in vivo. Auch wenn es sich im Falle des Einsatzes von Kalziumkanalagonisten nicht um eine kausale Therapie, wie zum Beispiel im Falle gentechnologischer Ansätze, handelt, stellen sie trotzdem eine vielversprechende Ergänzung des Portfolios an therapeutischen Optionen dar. Die Stärke liegt hierbei in dem sofortigen Wirkeintritt nach Applikation mit antizipiert rascher Symptomverbesserung.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der SMN1 und SMN2 Region des Chromosomen 5	8
Abb. 2	Unterschied des SMN 1 und 2 Gens in Transkription und Translation	10
Abb. 3	Schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte und der relevanten Kalziumströme	23
Abb. 4	Schematische Darstellung der Struktur eines spannungsabhängigen Kalziumkanals.	24
Abb. 5	Strukturformel der Enantiomere R-Roscovitine und S-Roscovitine	27
Abb. 6	R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des axonalen Längenwachstums in der Motoneuronkultur auf Laminin-221	46
Abb. 7	Exemplarische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Motoneuronen auf Laminin-221 nach Kultivierung mit ω -Conotoxin und R-Roscovitine	47
Abb. 8	R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin	48
Abb. 9	R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Größe der Wachstumskegel, sowie der Menge an β -Aktin	50
Abb. 10	.): R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung der Intensität des $Ca_v2.2$ Kalziumkanals	52
Abb. 11	S-Roscovitine führt nicht zu einer Normalisierung der Axonlängen auf Laminin-221	55
Abb. 12	Exemplarische Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Motoneuronen auf Laminin-221 nach Kultivierung mit R-Roscovitine und S-Roscovitine	56
Abb. 13	Die Proteinmenge an CDK 5 ist im Falle der spinalen Muskelatrophie nicht erhöht, und der Einsatz von R-Roscovitine beeinflusst die CDK 5-Proteinmenge nicht	57
Abb. 14	Die pränatale Behandlung des Muttertiers mit $0,5\mu\text{M}$ R-Roscovitine führt zu einer Normalisierung des Längenwachstums auf Laminin-221	59

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Klassifikation und Subtypen der spinalen Muskelatrophie	7
Tab. 2	Eingesetzte Primärantikörper	35
Tab. 3	Eingesetzte Sekundärantikörper	35
Tab. 4	Eingesetzte Enzyme	35
Tab. 5	Eingesetzte Primer	36
Tab. 6	PCR Ansatz	39
Tab. 7	Meilensteine im Krankheitsverständnis der Therapie der SMA	61
Tab. 8	Konzentrationsabhängige Beeinflussung des Ca _v 2.2-N-Typ-Kalziumkanals durch R-Roscovitine und S-Roscovitine	68

7.3 Literaturverzeichnis

(2019). "Note: Zolgensma data manipulation." *Med Lett Drugs Ther* 61(1579): 129.

(2019). "Zolgensma - one-time gene therapy for spinal muscular atrophy." *Med Lett Drugs Ther* 61(1577): 113-114.

Abaza, M. S., A. M. Bahman and R. J. Al-Attiyah (2008). "Roscovitine synergizes with conventional chemo-therapeutic drugs to induce efficient apoptosis of human colorectal cancer cells." *World J Gastroenterol* 14(33): 5162-5175.

Ade-Biassette, H., C. Verney, K. Peoc'h, M. C. Dauge, F. Razavi, L. Choudat, P. Gressens, H. Budka and D. Henin (2006). "Immunohistochemical expression of prion protein (PrPC) in the human forebrain during development." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(7): 698-706.

Anagnostou, E., S. P. Miller, M. C. Guiot, G. Karpati, L. Simard, M. E. Dilenge and M. I. Shevell (2005). "Type I spinal muscular atrophy can mimic sensory-motor axonal neuropathy." *J Child Neurol* 20(2): 147-150.

Andreassi, C., J. Jarecki, J. Zhou, D. D. Covert, U. R. Monani, X. Chen, M. Whitney, B. Pollok, M. Zhang, E. Androphy and A. H. Burghes (2001). "Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients." *Hum Mol Genet* 10(24): 2841-2849.

Angelo, M., F. Plattner and K. P. Giese (2006). "Cyclin-dependent kinase 5 in synaptic plasticity, learning and memory." *J Neurochem* 99(2): 353-370.

Araujo, I. M., B. P. Carreira, C. M. Carvalho and A. P. Carvalho (2010). "Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity." *Neurochem Res* 35(12): 1966-1969.

Azzouz, M., T. Le, G. S. Ralph, L. Walmsley, U. R. Monani, D. C. Lee, F. Wilkes, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, A. H. Burghes and N. D. Mazarakis (2004).

"Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy." *J Clin Invest* 114(12): 1726-1731.

Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2002). "Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex." *J Biol Chem* 277(35): 31957-31962.

Bach, S., M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S. P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D. C. Liang, H. Galons, J. F. Dierick, L. A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schachtele, A. S. Lerman, A. Carnero, Y. Wan, N. Gray and L. Meijer (2005). "Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase." *J Biol Chem* 280(35): 31208-31219.

Battaglia, G., A. Princivale, F. Forti, C. Lizier and M. Zeviani (1997). "Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system." *Hum Mol Genet* 6(11): 1961-1971.

Baughan, T. D., A. Dickson, E. Y. Osman and C. L. Lorson (2009). "Delivery of bifunctional RNAs that target an intronic repressor and increase SMN levels in an animal model of spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* 18(9): 1600-1611.

Bechade, C., P. Rostaing, C. Cisterni, R. Kalisch, V. La Bella, B. Pettmann and A. Triller (1999). "Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport." *Eur J Neurosci* 11(1): 293-304.

Bersano, A., E. Ballabio, S. Lanfranconi, G. B. Boncoraglio, S. Corti, F. Locatelli, P. Baron, N. Bresolin, E. Parati and L. Candelise (2010). "Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review." *Curr Vasc Pharmacol* 8(1): 29-34.

Brahe, C., S. Servidei, S. Zappata, E. Ricci, P. Tonali and G. Neri (1995). "Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy." *Lancet* 346(8977): 741-742.

Bukanov, N. O., L. A. Smith, K. W. Klinger, S. R. Ledbetter and O. Ibraghimov-Beskrovnaya (2006). "Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine." *Nature* 444(7121): 949-952.

Buraei, Z., M. Anghelescu and K. S. Elmslie (2005). "Slowed N-type calcium channel (CaV2.2) deactivation by the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine." *Biophys J* 89(3): 1681-1691.

Buraei, Z. and K. S. Elmslie (2008). "The separation of antagonist from agonist effects of trisubstituted purines on CaV2.2 (N-type) channels." *J Neurochem* 105(4): 1450-1461.

Buraei, Z., H. K. Lee and K. S. Elmslie (2015). "Single channel measurements demonstrate the voltage dependence of permeation through N-type and L-type CaV channels." *Channels (Austin)* 9(1): 50-55.

Buraei, Z., H. Liang and K. S. Elmslie (2014). "Voltage control of Ca²⁺ permeation through N-type calcium (Ca_v2.2) channels." *J Gen Physiol* 144(3): 207-220.
Buraei, Z., G. Schofield and K. S. Elmslie (2007). "Roscovitine differentially affects Ca_v2 and K_v channels by binding to the open state." *Neuropharmacology* 52(3): 883-894.

Buraei, Z. and J. Yang (2010). "The α_1 subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Physiol Rev* 90(4): 1461-1506.

Buraei, Z. and J. Yang (2015). "Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels by RGK Proteins." *Curr Mol Pharmacol* 8(2): 180-187.

Burgeson, R. E., M. Chiquet, R. Deutzmann, P. Ekblom, J. Engel, H. Kleinman, G. R. Martin, G. Meneguzzi, M. Paulsson, J. Sanes and et al. (1994). "A new nomenclature for the laminins." *Matrix Biol* 14(3): 209-211.

Burghes, A. H. (1997). "When is a deletion not a deletion? When it is converted." *Am J Hum Genet* 61(1): 9-15.

Burglen, L., S. Lefebvre, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, C. Cruaud, A. Munnich and J. Melki (1996). "Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene." *Genomics* 32(3): 479-482.

Burlet, P., C. Huber, S. Bertrand, M. A. Ludosky, I. Zwaenepoel, O. Clermont, J. Roume, A. L. Delezoide, J. Cartaud, A. Munnich and S. Lefebvre (1998). "The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* 7(12): 1927-1933.

Byers, R. K. and B. Q. Banker (1961). "Infantile muscular atrophy." *Arch Neurol* 5: 140-164.

Camins, A., E. Verdaguer, J. Folch and M. Pallas (2006). "Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes." *CNS Drug Rev* 12(2): 135-148.

Carissimi, C., L. Saieva, J. Baccon, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappasilber and L. Pellizzoni (2006). "Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly." *J Biol Chem* 281(12): 8126-8134.

Cartegni, L. and A. R. Krainer (2002). "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1." *Nat Genet* 30(4): 377-384.

Carter, T. A., C. G. Bonnemann, C. H. Wang, S. Obici, E. Parano, M. De Fatima Bonaldo, B. M. Ross, G. K. Penchaszadeh, A. Mackenzie, M. B. Soares, L. M. Kunkel and T. C. Gilliam (1997). "A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions." *Hum Mol Genet* 6(2): 229-236.

Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 411-425.

Chae, T., Y. T. Kwon, R. Bronson, P. Dikkes, E. Li and L. H. Tsai (1997). "Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality." *Neuron* 18(1): 29-42.

Chang, J. G., H. M. Hsieh-Li, Y. J. Jong, N. M. Wang, C. H. Tsai and H. Li (2001). "Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9808-9813.

Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann and G. Dreyfuss (1999). "Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems." *J Cell Biol* 147(6): 1181-1194.

Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, M. Mann and G. Dreyfuss (2000). "Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli." *J Cell Biol* 148(6): 1177-1186.

Chen, J., S. E. Billings and H. Nishimune (2011). "Calcium channels link the muscle-derived synapse organizer laminin beta2 to Bassoon and CAST/Erc2 to organize presynaptic active zones." *J Neurosci* 31(2): 512-525.

Cheung, Z. H. and N. Y. Ip (2007). "The roles of cyclin-dependent kinase 5 in dendrite and synapse development." *Biotechnol J* 2(8): 949-957.

Cho, S. and S. D. Meriney (2006). "The effects of presynaptic calcium channel modulation by roscovitine on transmitter release at the adult frog neuromuscular junction." *Eur J Neurosci* 23(12): 3200-3208.

Cicenas, J., K. Kalyan, A. Sorokinas, E. Stankunas, J. Levy, I. Meskinyte, V. Stankevicius, A. Kaupinis and M. Valius (2015). "Roscovitine in cancer and other diseases." *Ann Transl Med* 3(10): 135.

Coady, T. H., T. D. Baughan, M. Shababi, M. A. Passini and C. L. Lorson (2008). "Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts." *PLoS One* 3(10): e3468.

Cohan, C. S., J. A. Connor and S. B. Kater (1987). "Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones." *J Neurosci* 7(11): 3588-3599.

Connor, J. A., S. B. Kater, C. Cohan and L. Fink (1990). "Ca²⁺ dynamics in neuronal growth cones: regulation and changing patterns of Ca²⁺ entry." *Cell Calcium* 11(2-3): 233-239.

Cooper, C., J. Cushnaghan, J. R. Kirwan, P. A. Dieppe, J. Rogers, T. McAlindon and F. McCrae (1992). "Radiographic assessment of the knee joint in osteoarthritis." *Ann Rheum Dis* 51(1): 80-82.

- Coovert, D. D., T. T. Le, P. E. McAndrew, J. Strasswimmer, T. O. Crawford, J. R. Mendell, S. E. Coulson, E. J. Androphy, T. W. Prior and A. H. Burghes (1997). "The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* 6(8): 1205-1214.
- Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, S. Salani, D. Ronchi, C. Simone, M. Falcone, D. Papadimitriou, F. Locatelli, N. Mezzina, F. Gianni, N. Bresolin and G. P. Comi (2010). "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice." *Brain* 133(Pt 2): 465-481.
- Crawford, T. O. and C. A. Pardo (1996). "The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy." *Neurobiol Dis* 3(2): 97-110.
- Crino, P. B. and J. Eberwine (1996). "Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis." *Neuron* 17(6): 1173-1187.
- Cruz, J. C., H. C. Tseng, J. A. Goldman, H. Shih and L. H. Tsai (2003). "Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles." *Neuron* 40(3): 471-483.
- Cusco, I., M. J. Barcelo, R. Rojas-Garcia, I. Illa, J. Gamez, C. Cervera, A. Pou, G. Izquierdo, M. Baiget and E. F. Tizzano (2006). "SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings." *J Neurol* 253(1): 21-25.
- de la Motte, S. and A. Gianella-Borradori (2004). "Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects." *Int J Clin Pharmacol Ther* 42(4): 232-239.
- DeStefino, N. R., A. A. Pilato, M. Dittrich, S. V. Cherry, S. Cho, J. R. Stiles and S. D. Meriney (2010). "(R)-roscovitine prolongs the mean open time of unitary N-type calcium channel currents." *Neuroscience* 167(3): 838-849.
- Dey, A., E. T. Wong, C. F. Cheek, V. Tergaonkar and D. P. Lane (2008). "R-Roscovitine simultaneously targets both the p53 and NF-kappaB pathways and causes potentiation of apoptosis: implications in cancer therapy." *Cell Death Differ* 15(2): 263-273.
- Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(10): 749-759.
- Dickson, A., E. Osman and C. L. Lorson (2008). "A negatively acting bifunctional RNA increases survival motor neuron both in vitro and in vivo." *Hum Gene Ther* 19(11): 1307-1315.
- DiDonato, C. J., S. E. Ingraham, J. R. Mendell, T. W. Prior, S. Lenard, R. T. Moxley, 3rd, J. Florence and A. H. Burghes (1997). "Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity?" *Ann Neurol* 41(2): 230-237.

Doktor, T. K., Y. Hua, H. S. Andersen, S. Broner, Y. H. Liu, A. Wieckowska, M. Dembic, G. H. Bruun, A. R. Krainer and B. S. Andresen (2017). "RNA-sequencing of a mouse-model of spinal muscular atrophy reveals tissue-wide changes in splicing of U12-dependent introns." *Nucleic Acids Res* 45(1): 395-416.

Dombert, B., S. Balk, P. Luningschror, M. Moradi, R. Sivadasan, L. Saal-Bauernschubert and S. Jablonka (2017). "BDNF/trkB Induction of Calcium Transients through Cav2.2 Calcium Channels in Motoneurons Corresponds to F-actin Assembly and Growth Cone Formation on beta2-Chain Laminin (221)." *Front Mol Neurosci* 10: 346.

Dominguez, E., T. Marais, N. Chatauret, S. Benkhelifa-Ziyyat, S. Duque, P. Ravassard, R. Carcenac, S. Astord, A. Pereira de Moura, T. Voit and M. Barkats (2011). "Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice." *Hum Mol Genet* 20(4): 681-693.

Dubowitz, V. (1964). "Infantile Muscular Atrophy. A Prospective Study with Particular Reference to a Slowly Progressive Variety." *Brain* 87: 707-718.

Dubowitz, V. (1967). "Infantile muscular atrophy--a broad spectrum." *Clin Proc Child Hosp Dist Columbia* 23(8): 223-239.

Dubowitz, V. (1999). "Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype." *Eur J Paediatr Neurol* 3(2): 49-51.

Echaniz-Laguna, A., P. Miniou, D. Bartholdi and J. Melki (1999). "The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements." *Am J Hum Genet* 64(5): 1365-1370.

Fan, L. and L. R. Simard (2002). "Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development." *Hum Mol Genet* 11(14): 1605-1614.

Fan, M., Z. Buraei, H. R. Luo, R. Levenson-Palmer and J. Yang (2010). "Direct inhibition of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channels by Gem does not require a direct Gem/Cavbeta interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33): 14887-14892.

Feldkotter, M., V. Schwarzer, R. Wirth, T. F. Wienker and B. Wirth (2002). "Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy." *Am J Hum Genet* 70(2): 358-368.

Feldman, D. H., B. M. Olivera and D. Yoshikami (1987). "Omega Conus geographus toxin: a peptide that blocks calcium channels." *FEBS Lett* 214(2): 295-300.

Finkel, R. S., M. P. McDermott, P. Kaufmann, B. T. Darras, W. K. Chung, D. M. Sproule, P. B. Kang, A. R. Foley, M. L. Yang, W. B. Martens, M. Oskoui, A. M. Glanzman, J. Flickinger, J. Montes, S. Dunaway, J. O'Hagen, J. Quigley, S. Riley, M. Benton, P. A. Ryan, M. Montgomery, J. Marra, C. Gooch and D. C. De Vivo (2014).

"Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials." *Neurology* 83(9): 810-817.

Finkel, R. S., E. Mercuri, B. T. Darras, A. M. Connolly, N. L. Kuntz, J. Kirschner, C. A. Chiriboga, K. Saito, L. Servais, E. Tizzano, H. Topaloglu, M. Tulinius, J. Montes, A. M. Glanzman, K. Bishop, Z. J. Zhong, S. Gheuens, C. F. Bennett, E. Schneider, W. Farwell, D. C. De Vivo and E. S. Group (2017). "Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy." *N Engl J Med* 377(18): 1723-1732.

Fischer, P. M. and A. Gianella-Borradori (2005). "Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors." *Expert Opin Investig Drugs* 14(4): 457-477.

Fischer, U., Q. Liu and G. Dreyfuss (1997). "The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis." *Cell* 90(6): 1023-1029.

Foust, K. D., X. Wang, V. L. McGovern, L. Braun, A. K. Bevan, A. M. Haidet, T. T. Le, P. R. Morales, M. M. Rich, A. H. Burghes and B. K. Kaspar (2010). "Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN." *Nat Biotechnol* 28(3): 271-274.

Fu, A. K., W. Y. Fu, J. Cheung, K. W. Tsim, F. C. Ip, J. H. Wang and N. Y. Ip (2001). "Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction." *Nat Neurosci* 4(4): 374-381.

Fu, A. K., F. C. Ip, W. Y. Fu, J. Cheung, J. H. Wang, W. H. Yung and N. Y. Ip (2005). "Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15224-15229.

Gall, J. G. (2000). "Cajal bodies: the first 100 years." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 273-300.

Garcia, E. L., Z. Lu, M. P. Meers, K. Praveen and A. G. Matera (2013). "Developmental arrest of *Drosophila* survival motor neuron (Smn) mutants accounts for differences in expression of minor intron-containing genes." *RNA*. 19(11): 1510-1516.

Giavazzi, A., V. Setola, A. Simonati and G. Battaglia (2006). "Neuronal-specific roles of the survival motor neuron protein: evidence from survival motor neuron expression patterns in the developing human central nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(3): 267-277.

Gilliam, T. C., L. M. Brzustowicz, L. H. Castilla, T. Lehner, G. K. Penchaszadeh, R. J. Daniels, B. C. Byth, J. Knowles, J. E. Hislop, Y. Shapira and et al. (1990). "Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy." *Nature* 345(6278): 823-825.

Girard, C., H. Neel, E. Bertrand and R. Bordonne (2006). "Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation." *Nucleic Acids Res* 34(10): 2925-2932.

Goodnough, L. T., T. H. Price, C. A. Parvin, K. D. Friedman, W. R. Vogler, N. Khan, R. Sacher, M. Johnston, M. Wissel and D. Ciavarella (1994). "Erythropoietin response to anaemia is not altered by surgery or recombinant human erythropoietin therapy." *Br J Haematol* 87(4): 695-699.

Grohmann, K., M. Schuelke, A. Diers, K. Hoffmann, B. Lucke, C. Adams, E. Bertini, H. Leonhardt-Horti, F. Muntoni, R. Ouvrier, A. Pfeufer, R. Rossi, L. Van Maldergem, J. M. Wilmshurst, T. F. Wienker, M. Sendtner, S. Rudnik-Schoneborn, K. Zerres and C. Hubner (2001). "Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1." *Nat Genet* 29(1): 75-77.

Gu, X., E. C. Olson and N. C. Spitzer (1994). "Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation." *J Neurosci* 14(11 Pt 1): 6325-6335.

Gu, X. and N. C. Spitzer (1995). "Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients." *Nature* 375(6534): 784-787.

Gurkoff, G., K. Shahlaie, B. Lyeth and R. Berman (2013). "Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury." *Pharmaceuticals (Basel)* 6(7): 788-812.

Hahnen, E., R. Forkert, C. Marke, S. Rudnik-Schoneborn, J. Schonling, K. Zerres and B. Wirth (1995). "Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals." *Hum Mol Genet* 4(10): 1927-1933.

Hall, Z. W. (1995). "Laminin beta 2 (S-laminin): a new player at the synapse." *Science* 269(5222): 362-363.

Harada, Y., R. Sutomo, A. H. Sadewa, T. Akutsu, Y. Takeshima, H. Wada, M. Matsuo and H. Nishio (2002). "Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity." *J Neurol* 249(9): 1211-1219.

Heidelberger, R., C. Heinemann, E. Neher and G. Matthews (1994). "Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal." *Nature* 371(6497): 513-515.

Hisanaga, S. and R. Endo (2010). "Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death." *J Neurochem* 115(6): 1309-1321.

Holmberg, J. and M. Durbeej (2013). "Laminin-211 in skeletal muscle function." *Cell Adh Migr* 7(1): 111-121.

Hoy, S. M. (2017). "Nusinersen: First Global Approval." *Drugs* 77(4): 473-479.

Hoy, S. M. (2018). "Nusinersen: A Review in 5q Spinal Muscular Atrophy." *CNS Drugs* 32(7): 689-696.

Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, C. H. Tsai and H. Li (2000). "A mouse model for spinal muscular atrophy." *Nat Genet* 24(1): 66-70.

Hua, Y., K. Sahashi, G. Hung, F. Rigo, M. A. Passini, C. F. Bennett and A. R. Krainer (2010). "Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model." *Genes Dev* 24(15): 1634-1644.

Hua, Y., T. A. Vickers, H. L. Okunola, C. F. Bennett and A. R. Krainer (2008). "Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice." *Am J Hum Genet* 82(4): 834-848.

Iannaccone, S. T. (1990). "Congenital myopathies." *Pediatr Neurol* 6(1): 66.

Iannaccone, S. T. (1998). "Spinal muscular atrophy." *Semin Neurol* 18(1): 19-26.

Imlach, W. L., E. S. Beck, B. J. Choi, F. Lotti, L. Pellizzoni and B. D. McCabe (2012). "SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*." *1994 Jun 3; 77(5): 727-36* 151(2): 427-439.

Iqbal, K., C. Alonso Adel, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C. X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai and I. Grundke-Iqbal (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3): 198-210.

Jablonka, S., M. Bandilla, S. Wiese, D. Buhler, B. Wirth, M. Sendtner and U. Fischer (2001). "Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* 10(5): 497-505.

Jablonka, S., M. Beck, B. D. Lechner, C. Mayer and M. Sendtner (2007). "Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy." *J Cell Biol* 179(1): 139-149.

Jablonka, S., W. Rossoll, B. Schrank and M. Sendtner (2000). "The role of SMN in spinal muscular atrophy." *J Neurol* 247 Suppl 1: I37-42.

Jablonka, S., B. Schrank, M. Kralewski, W. Rossoll and M. Sendtner (2000). "Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III." *Hum Mol Genet* 9(3): 341-346.

Jablonka, S. and M. Sendtner (2003). "Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(3): 144-149.

Jessberger, S., S. Aigner, G. D. Clemenson, Jr., N. Toni, D. C. Lie, O. Karalay, R. Overall, G. Kempermann and F. H. Gage (2008). "Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus." *PLoS Biol* 6(11): e272.

Kamp, M. A., D. Hanggi, H. J. Steiger and T. Schneider (2012). "Diversity of presynaptic calcium channels displaying different synaptic properties." *Rev Neurosci* 23(2): 179-190.

Kariya, S., G. H. Park, Y. Maeno-Hikichi, O. Leykekhman, C. Lutz, M. S. Arkovitz, L. T. Landmesser and U. R. Monani (2008). "Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy." *Hum Mol Genet* 17(16): 2552-2569.

Kaviani, M., S. Keshtkar, N. Azarpira, M. H. Aghdaei, B. Geramizadeh, M. H. Karimi, A. Shamsaeefar, N. Motazedian, S. Nikeghbalian, I. H. Al-Abdullah and M. H. Ghahremani (2019). "Cytoprotective effects of olesoxime on isolated human pancreatic islets in order to attenuate apoptotic pathway." *Biomed Pharmacother* 112: 108674.

Kearns, G. L., S. M. Abdel-Rahman, S. W. Alander, D. L. Blowey, J. S. Leeder and R. E. Kauffman (2003). "Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children." *N Engl J Med* 349(12): 1157-1167.

Keeler, A. M. and T. R. Flotte (2019). "Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here?" *Annu Rev Virol* 6(1): 601-621.

Khanna, R., Q. Li, J. Bewersdorf and E. F. Stanley (2007). "The presynaptic CaV2.2 channel-transmitter release site core complex." *Eur J Neurosci* 26(3): 547-559.

Kislauskis, E. H., X. Zhu and R. H. Singer (1997). "beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility." *J Cell Biol* 136(6): 1263-1270.

Kittel, R. J., C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann and S. J. Sigrist (2006). "Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release." *Science* 312(5776): 1051-1054.

Knockaert, M. and L. Meijer (2002). "Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography." *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 819-825.
Kolb, S. J. and J. T. Kissel (2011). "Spinal muscular atrophy: a timely review." *Arch Neurol* 68(8): 979-984.

Kolb, S. J. and J. T. Kissel (2015). "Spinal Muscular Atrophy." *Neurol Clin* 33(4): 831-846.

Kugelberg, E. and L. Welander (1956). "Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy." *AMA Arch Neurol Psychiatry* 75(5): 500-509.

Kwon, Y. T., L. H. Tsai and J. E. Crandall (1999). "Callosal axon guidance defects in p35(-/-) mice." *J Comp Neurol* 415(2): 218-229.

Lambert, L. A., N. Qiao, K. K. Hunt, D. H. Lambert, G. B. Mills, L. Meijer and K. Keyomarsi (2008). "Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model." *Cancer Res* 68(19): 7966-7974.

- Landis, D. M., A. K. Hall, L. A. Weinstein and T. S. Reese (1988). "The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse." *Neuron* 1(3): 201-209.
- Le Tourneau, C., S. Faivre, V. Laurence, C. Delbaldo, K. Vera, V. Girre, J. Chiao, S. Armour, S. Frame, S. R. Green, A. Gianella-Borradori, V. Dieras and E. Raymond (2010). "Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies." *Eur J Cancer* 46(18): 3243-3250.
- Le, T. T., D. D. Covert, U. R. Monani, G. E. Morris and A. H. Burghes (2000). "The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization." *Neurogenetics* 3(1): 7-16.
- Le, T. T., L. T. Pham, M. E. Butchbach, H. L. Zhang, U. R. Monani, D. D. Covert, T. O. Gavrilina, L. Xing, G. J. Bassell and A. H. Burghes (2005). "SMN Δ 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(6): 845-857.
- Lee, H. K. and K. S. Elmslie (1999). "Gating of single N-type calcium channels recorded from bullfrog sympathetic neurons." *J Gen Physiol* 113(1): 111-124.
- Lefebvre, F., J. Glorieux and T. St-Laurent-Gagnon (1996). "Neonatal survival and disability rate at age 18 months for infants born between 23 and 28 weeks of gestation." *Am J Obstet Gynecol* 174(3): 833-838.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burllet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani and et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." *Cell* 80(1): 155-165.
- Lefebvre, S., P. Burllet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss and J. Melki (1997). "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy." *Nat Genet* 16(3): 265-269.
- Li, B. S., L. Zhang, S. Takahashi, W. Ma, H. Jaffe, A. B. Kulkarni and H. C. Pant (2002). "Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3." *EMBO J* 21(3): 324-333.
- Li, S., D. Edgar, R. Fassler, W. Wadsworth and P. D. Yurchenco (2003). "The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization." *Dev Cell* 4(5): 613-624.
- Lim, S. R. and K. J. Hertel (2001). "Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing." *J Biol Chem* 276(48): 45476-45483.
- Linker, R. A., M. Maurer, S. Gaupp, R. Martini, B. Holtmann, R. Giess, P. Rieckmann, H. Lassmann, K. V. Toyka, M. Sendtner and R. Gold (2002). "CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation." *Nat Med* 8(6): 620-624.

- Liu, J., M. C. Liu and K. K. Wang (2008). "Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity." *Sci Signal* 1(14): re1.
- Liu, L., D. Xing, W. R. Chen, T. Chen, Y. Pei and X. Gao (2008). "Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis." *Int J Cancer* 122(10): 2210-2222.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1996). "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein." *EMBO J* 15(14): 3555-3565.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang and G. Dreyfuss (1997). "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins." *Cell* 90(6): 1013-1021.
- Liu, Q., H. Siomi, M. C. Siomi, U. Fischer, Y. Zhang, L. Wan and G. Dreyfuss (1996). "Molecular characterization of the protein products of the fragile X syndrome gene and the survival of motor neurons gene." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61: 689-697.
- Lotti, F., W. L. Imlach, L. Saieva, E. S. Beck, T. Hao le, D. K. Li, W. Jiao, G. Z. Mentis, C. E. Beattie, B. D. McCabe and L. Pellizzoni (2012). "An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function." *Cell* 151(2): 440-454
- Lopes, J. P. and P. Agostinho (2011). "Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions." *Prog Neurobiol* 94(1): 49-63.
- Lopes, J. P., C. R. Oliveira and P. Agostinho (2009). "Cdk5 acts as a mediator of neuronal cell cycle re-entry triggered by amyloid-beta and prion peptides." *Cell Cycle* 8(1): 97-104.
- Lopes, J. P., C. R. Oliveira and P. Agostinho (2010). "Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5." *Aging Cell* 9(1): 64-77.
- Lorson, C. L. and E. J. Androphy (2000). "An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN." *Hum Mol Genet* 9(2): 259-265.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy and B. Wirth (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(11): 6307-6311.
- Lorson, C. L., H. Rindt and M. Shababi (2010). "Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies." *Hum Mol Genet* 19(R1): R111-118.
- Lorson, C. L., J. Strasswimmer, J. M. Yao, J. D. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A. H. Burghes and E. J. Androphy (1998). "SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity." *Nat Genet* 19(1): 63-66.
- Luckenbill-Edds, L. (1997). "Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth." *Brain Res Brain Res Rev* 23(1-2): 1-27.

MacLeod, M. J., J. E. Taylor, P. W. Lunt, C. G. Mathew and S. A. Robb (1999). "Prenatal onset spinal muscular atrophy." *Eur J Paediatr Neurol* 3(2): 65-72.

Maggiorella, L., E. Deutsch, V. Frascogna, N. Chavaudra, L. Jeanson, F. Milliat, F. Eschwege and J. Bourhis (2003). "Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo." *Cancer Res* 63(10): 2513-2517.

McCleskey, E. W., A. P. Fox, D. H. Feldman, L. J. Cruz, B. M. Olivera, R. W. Tsien and D. Yoshikami (1987). "Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12): 4327-4331.

McClue, S. J., D. Blake, R. Clarke, A. Cowan, L. Cummings, P. M. Fischer, M. MacKenzie, J. Melville, K. Stewart, S. Wang, N. Zhelev, D. Zheleva and D. P. Lane (2002). "In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)." *Int J Cancer* 102(5): 463-468.

Meijer, L. and E. Raymond (2003). "Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials." *Acc Chem Res* 36(6): 417-425.

Meijer, O. W., B. J. Slotman, J. G. Wolbers, J. C. Baayen and J. J. Peters (1997). "[Multidisciplinary treatment of cerebral arteriovenous malformations: preliminary results in 115 consecutive patients]." *Ned Tijdschr Geneesk* 141(52): 2587-2588.

Meister, G., C. Eggert and U. Fischer (2002). "SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story." *Trends Cell Biol.* 12(10): 472-478.

Melki, J., P. Sheth, S. Abdelhak, P. Burlet, M. F. Bachelot, M. G. Lathrop, J. Frezal and A. Munnich (1990). "Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators." *Lancet* 336(8710): 271-273.

Mendell, J. R., S. Al-Zaidy, R. Shell, W. D. Arnold, L. R. Rodino-Klapac, T. W. Prior, L. Lowes, L. Alfano, K. Berry, K. Church, J. T. Kissel, S. Nagendran, J. L'Italien, D. M. Sproule, C. Wells, J. A. Cardenas, M. D. Heitzer, A. Kaspar, S. Corcoran, L. Braun, S. Likhite, C. Miranda, K. Meyer, K. D. Foust, A. H. M. Burghes and B. K. Kaspar (2017). "Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy." *N Engl J Med* 377(18): 1713-1722.

Mercuri, E., E. Bertini, S. Messina, A. Solari, A. D'Amico, C. Angelozzi, R. Battini, A. Berardinelli, P. Boffi, C. Bruno, C. Cini, F. Colitto, M. Kinali, C. Minetti, T. Mongini, L. Morandi, G. Neri, S. Orcesi, M. Pane, M. Pelliccioni, A. Pini, F. D. Tiziano, M. Villanova, G. Vita and C. Brahe (2007). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy." *Neurology* 68(1): 51-55.

Messina, M. F., S. Messina, M. Gaeta, C. Rodolico, A. M. Salpietro Damiano, F. Lombardo, G. Crisafulli and F. De Luca (2012). "Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type I (SMARD 1): an atypical phenotype and review of the literature." *Eur J Paediatr Neurol* 16(1): 90-94.

Miguel-Aliaga, I., Y. B. Chan, K. E. Davies and M. van den Heuvel (2000). "Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*." *FEBS Lett* 486(2): 99-102.

Miguel-Aliaga, I., E. Culetto, D. S. Walker, H. A. Baylis, D. B. Sattelle and K. E. Davies (1999). "The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability." *Hum Mol Genet* 8(12): 2133-2143.

Miller, N., Z. Feng, B. M. Edens, B. Yang, H. Shi, C. C. Sze, B. T. Hong, S. C. Su, J. A. Cantu, J. Topczewski, T. O. Crawford, C. P. Ko, C. J. Sumner, L. Ma and Y. C. Ma (2015). "Non-aggregating tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 contributes to motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy." *J Neurosci* 35(15): 6038-6050.

Mohr, E. and D. Richter (2001). "Messenger RNA on the move: implications for cell polarity." *Int J Biochem Cell Biol* 33(7): 669-679.

Monani, U. R., C. L. Lorson, D. W. Parsons, T. W. Prior, E. J. Androphy, A. H. Burghes and J. D. McPherson (1999). "A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2." *Hum Mol Genet* 8(7): 1177-1183.

Monani, U. R., J. D. McPherson and A. H. Burghes (1999). "Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT)." *Biochim Biophys Acta* 1445(3): 330-336.

Monani, U. R., M. T. Pastore, T. O. Gavrilina, S. Jablonka, T. T. Le, C. Andreassi, J. M. DiCocco, C. Lorson, E. J. Androphy, M. Sendtner, M. Podell and A. H. Burghes (2003). "A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy." *J Cell Biol* 160(1): 41-52.

Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Covert, D. W. Parsons, C. Andreassi, T. T. Le, S. Jablonka, B. Schrank, W. Rossoll, T. W. Prior, G. E. Morris and A. H. Burghes (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(3): 333-339.

Moradi, M., R. Sivadasan, L. Saal, P. Luningschror, B. Dombert, R. J. Rathod, D. C. Dieterich, R. Blum and M. Sendtner (2017). "Differential roles of alpha-, beta-, and gamma-actin in axon growth and collateral branch formation in motoneurons." *J Cell Biol* 216(3): 793-814.

Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291.

Morris, M., S. Maeda, K. Vossel and L. Mucke (2011). "The many faces of tau." *Neuron* 70(3): 410-426.

Munsat, T. L. and K. E. Davies (1992). "International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany)." *Neuromuscul Disord* 2(5-6): 423-428.

Naryshkin, N. A., M. Weetall, A. Dakka, J. Narasimhan, X. Zhao, Z. Feng, K. K. Ling, G. M. Karp, H. Qi, M. G. Woll, G. Chen, N. Zhang, V. Gabbeta, P. Vazirani, A. Bhattacharyya, B. Furia, N. Risher, J. Sheedy, R. Kong, J. Ma, A. Turpoff, C. S. Lee, X. Zhang, Y. C. Moon, P. Trifillis, E. M. Welch, J. M. Colacino, J. Babiak, N. G. Almstead, S. W. Peltz, L. A. Eng, K. S. Chen, J. L. Mull, M. S. Lynes, L. L. Rubin, P. Fontoura, L. Santarelli, D. Haehnke, K. D. McCarthy, R. Schmucki, M. Ebeling, M. Sivaramakrishnan, C. P. Ko, S. V. Paushkin, H. Ratni, I. Gerlach, A. Ghosh and F. Metzger (2014). "Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy." *Science* 345(6197): 688-693.

Nguyen, M. D., W. E. Mushynski and J. P. Julien (2002). "Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration." *Cell Death Differ* 9(12): 1294-1306.

Nishimune, H., J. R. Sanes and S. S. Carlson (2004). "A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals." *Nature* 432(7017): 580-587.

Nishimune, H., G. Valdez, G. Jarad, C. L. Moulson, U. Muller, J. H. Miner and J. R. Sanes (2008). "Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction." *J Cell Biol* 182(6): 1201-1215.

Noakes, P. G., M. Gautam, J. Mudd, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). "Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2." *Nature* 374(6519): 258-262.

Noble, W., V. Olm, K. Takata, E. Casey, O. Mary, J. Meyerson, K. Gaynor, J. LaFrancois, L. Wang, T. Kondo, P. Davies, M. Burns, Veeranna, R. Nixon, D. Dickson, Y. Matsuoka, M. Ahlijanian, L. F. Lau and K. Duff (2003). "Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo." *Neuron* 38(4): 555-565.

Novelli, G., L. Calza, P. Amicucci, L. Giardino, M. Pozza, V. Silani, A. Pizzuti, M. Gennarelli, G. Piombo, F. Capon and B. Dallapiccola (1997). "Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues." *Biochem Mol Med* 61(1): 102-106.

O'Sullivan, B. P. and S. D. Freedman (2009). "Cystic fibrosis." *Lancet* 373(9678): 1891-1904.

Pagliardini, S., A. Giavazzi, V. Setola, C. Lizier, M. Di Luca, S. DeBiasi and G. Battaglia (2000). "Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord." *Hum Mol Genet* 9(1): 47-56.

Paglini, G., G. Pigino, P. Kunda, G. Morfini, R. Maccioni, S. Quiroga, A. Ferreira and A. Caceres (1998). "Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth." *J Neurosci* 18(23): 9858-9869.

Paprskarova, M., V. Krystof, R. Jorda, P. Dzubak, M. Hajduch, J. Wesierska-Gadek and M. Strnad (2009). "Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine." *J Cell Biochem* 107(3): 428-437.

Parsons, D. W., P. E. McAndrew, P. S. Allinson, W. D. Parker, Jr., A. H. Burghes and T. W. Prior (1998). "Diagnosis of spinal muscular atrophy in an SMN non-deletion

patient using a quantitative PCR screen and mutation analysis." *J Med Genet* 35(8): 674-676.

Passini, M. A., J. Bu, E. M. Roskelley, A. M. Richards, S. P. Sardi, C. R. O'Riordan, K. W. Klingler, L. S. Shihabuddin and S. H. Cheng (2010). "CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy." *J Clin Invest* 120(4): 1253-1264.

Patrick, C., L. Crews, P. Desplats, W. Dumaop, E. Rockenstein, C. L. Achim, I. P. Everall and E. Masliah (2011). "Increased CDK5 expression in HIV encephalitis contributes to neurodegeneration via tau phosphorylation and is reversed with Roscovitine." *Am J Pathol* 178(4): 1646-1661.

Pearn, J. (1980). "Classification of spinal muscular atrophies." *Lancet* 1(8174): 919-922.

Pearn, J. H. (1973). "The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England." *J Med Genet* 10(3): 260-265.

Pearn, J. H., P. Hudgson and J. N. Walton (1978). "A clinical and genetic study of spinal muscular atrophy of adult onset: the autosomal recessive form as a discrete disease entity." *Brain* 101(4): 591-606.

Pellizzoni, L., J. Baccon, B. Charroux and G. Dreyfuss (2001). "The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1." *Curr Biol* 11(14): 1079-1088.

Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux and G. Dreyfuss (1998). "A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing." *Cell* 95(5): 615-624.

Pevarello, P., S. Cainarca, C. Liberati, P. Tarroni, F. Piscitelli and E. Severi (2014). "Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel inhibitors." *Pharm Pat Anal* 3(2): 171-182.

Piepers, S., L. H. van den Berg, F. Brugman, H. Scheffer, M. Ruitkamp-Versteeg, B. G. van Engelen, C. G. Faber, M. de Visser, W. L. van der Pol and J. H. Wokke (2008). "A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4." *J Neurol* 255(9): 1400-1404.

Poirier, A., M. Weetall, K. Heinig, F. Bucheli, K. Schoenlein, J. Alsenz, S. Bassett, M. Ullah, C. Senn, H. Ratni, N. Naryshkin, S. Paushkin and L. Mueller (2018). "Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs." *Pharmacol Res Perspect* 6(6): e00447.

Porter, B. E. and J. R. Sanes (1995). "Gated migration: neurons migrate on but not onto substrates containing S-laminin." *Dev Biol* 167(2): 609-616.

Porter, B. E., J. Weis and J. R. Sanes (1995). "A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin." *Neuron* 14(3): 549-559.

- Prior, T. W., K. J. Swoboda, H. D. Scott and A. Q. Hejmanowski (2004). "Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2." *Am J Med Genet A* 130A(3): 307-310.
- Probst, J. (1982). "[The stiff hip (post-traumatic ankylosis)]." *Unfallchirurgie* 8(5): 315-327.
- Rak, K., B. D. Lechner, C. Schneider, H. Drexler, M. Sendtner and S. Jablonka (2009). "Valproic acid blocks excitability in SMA type I mouse motor neurons." *Neurobiol Dis* 36(3): 477-487.
- Ratni, H., G. M. Karp, M. Weetall, N. A. Naryshkin, S. V. Paushkin, K. S. Chen, K. D. McCarthy, H. Qi, A. Turpoff, M. G. Woll, X. Zhang, N. Zhang, T. Yang, A. Dakka, P. Vazirani, X. Zhao, E. Pinard, L. Green, P. David-Pierson, D. Tuerck, A. Poirier, W. Muster, S. Kirchner, L. Mueller, I. Gerlach and F. Metzger (2016). "Specific Correction of Alternative Survival Motor Neuron 2 Splicing by Small Molecules: Discovery of a Potential Novel Medicine To Treat Spinal Muscular Atrophy." *J Med Chem* 59(13): 6086-6100.
- Reuter, M., U. Stock, U. Janig and H. Kraemer-Hansen (1996). "[Metastatic pulmonary calcification as a rare complication of terminal kidney failure: the x-ray and CT findings]." *Rofo* 165(5): 493-495.
- Rochette, C. F., N. Gilbert and L. R. Simard (2001). "SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*." *Hum Genet* 108(3): 255-266.
- Rogers, R. S. and H. Nishimune (2017). "The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions." *Matrix Biol* 57-58: 86-105.
- Rossoll, W., S. Jablonka, C. Andreassi, A. K. Kroning, K. Karle, U. R. Monani and M. Sendtner (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(4): 801-812.
- Rousselet, E., A. Letondor, B. Menn, Y. Courbebaisse, M. L. Quille and S. Timsit (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(6): 1070-1084.
- Rudnik-Schoneborn, S., H. H. Goebel, W. Schlote, S. Molaian, H. Omran, U. Ketelsen, R. Korinthenberg, D. Wenzel, H. Lauffer, M. Kreiss-Nachtsheim, B. Wirth and K. Zerres (2003). "Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy." *Neurology* 60(6): 983-987.
- Rudnik-Schoneborn, S., I. Hausmanowa-Petrusewicz, J. Borkowska and K. Zerres (2001). "The predictive value of achieved motor milestones assessed in 441 patients with infantile spinal muscular atrophy types II and III." *Eur Neurol* 45(3): 174-181.

Ruiz, R., J. J. Casanas, L. Torres-Benito, R. Cano and L. Tabares (2010). "Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice." *J Neurosci* 30(3): 849-857.

Russman, B. S. (2007). "Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity." *J Child Neurol* 22(8): 946-951.

Russman, B. S., C. R. Buncher, M. White, F. J. Samaha and S. T. Iannaccone (1996). "Function changes in spinal muscular atrophy II and III. The DCN/SMA Group." *Neurology* 47(4): 973-976.

Sato, K., Y. S. Zhu, T. Saito, K. Yotsumoto, A. Asada, M. Hasegawa and S. Hisanaga (2007). "Regulation of membrane association and kinase activity of Cdk5-p35 by phosphorylation of p35." *J Neurosci Res* 85(14): 3071-3078.

Schang, L. M. (2004). "Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication." *Biochim Biophys Acta* 1697(1-2): 197-209.

Schang, L. M., A. Bantly, M. Knockaert, F. Shaheen, L. Meijer, M. H. Malim, N. S. Gray and P. A. Schaffer (2002). "Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins." *J Virol* 76(15): 7874-7882.

Schmalbruch, H. and G. Haase (2001). "Spinal muscular atrophy: present state." *Brain Pathol* 11(2): 231-247.

Schmalbruch, H. and D. M. Lewis (2000). "Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles." *Muscle Nerve* 23(4): 617-626.

Schmutz, J., J. Martin, A. Terry, O. Couronne, J. Grimwood, S. Lowry, L. A. Gordon, D. Scott, G. Xie, W. Huang, U. Hellsten, M. Tran-Gyamfi, X. She, S. Prabhakar, A. Aerts, M. Altherr, E. Bajorek, S. Black, E. Branscomb, C. Caoile, J. F. Challacombe, Y. M. Chan, M. Denys, J. C. Detter, J. Escobar, D. Flowers, D. Fotopulos, T. Glavina, M. Gomez, E. Gonzales, D. Goodstein, I. Grigoriev, M. Groza, N. Hammon, T. Hawkins, L. Haydu, S. Israni, J. Jett, K. Kadner, H. Kimball, A. Kobayashi, F. Lopez, Y. Lou, D. Martinez, C. Medina, J. Morgan, R. Nandkeshwar, J. P. Noonan, S. Pitluck, M. Pollard, P. Predki, J. Priest, L. Ramirez, J. Retterer, A. Rodriguez, S. Rogers, A. Salamov, A. Salazar, N. Thayer, H. Tice, M. Tsai, A. Ustaszewska, N. Vo, J. Wheeler, K. Wu, J. Yang, M. Dickson, J. F. Cheng, E. E. Eichler, A. Olsen, L. A. Pennacchio, D. S. Rokhsar, P. Richardson, S. M. Lucas, R. M. Myers and E. M. Rubin (2004). "The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5." *Nature* 431(7006): 268-274.

Schrank, B., R. Gotz, J. M. Gunnensen, J. M. Ure, K. V. Toyka, A. G. Smith and M. Sendtner (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(18): 9920-9925.

Shahani, N. and R. Brandt (2002). "Functions and malfunctions of the tau proteins." *Cell Mol Life Sci* 59(10): 1668-1680.

Sharma, A., A. Lambrechts, T. Hao le, T. T. Le, C. A. Sewry, C. Ampe, A. H. Burghes and G. E. Morris (2005). "A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells." *Exp Cell Res* 309(1): 185-197.

Singh, N. K., N. N. Singh, E. J. Androphy and R. N. Singh (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(4): 1333-1346.

Singh, N. N., E. J. Androphy and R. N. Singh (2004). "An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy." *Biochem Biophys Res Commun* 315(2): 381-388.

Singh, R. K. and B. Sharma (2004). "In vivo alteration in protein metabolism by subacute carbofuran intoxication in the freshwater teleost, *Clarias batrachus*." *Bull Environ Contam Toxicol* 73(5): 919-926.

Sivaramakrishnan, M., K. D. McCarthy, S. Campagne, S. Huber, S. Meier, A. Augustin, T. Heckel, H. Meistermann, M. N. Hug, P. Birrer, A. Moursy, S. Khawaja, R. Schmucki, N. Berntenis, N. Giroud, S. Golling, M. Tzouros, B. Banfai, G. Duran-Pacheco, J. Lamerz, Y. Hsiu Liu, T. Luebbers, H. Ratni, M. Ebeling, A. Clery, S. Paushkin, A. R. Krainer, F. H. Allain and F. Metzger (2017). "Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers." *Nat Commun* 8(1): 1476.

Smith, L. A., N. O. Bukanov, H. Husson, R. J. Russo, T. C. Barry, A. L. Taylor, D. R. Beier and O. Ibraghimov-Beskrovnaya (2006). "Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease." *J Am Soc Nephrol* 17(10): 2821-2831.

Sturm, S., A. Gunther, B. Jaber, P. Jordan, N. Al Kotbi, N. Parkar, Y. Cleary, N. Frances, T. Bergauer, K. Heinig, H. Kletzl, A. Marquet, H. Ratni, A. Poirier, L. Muller, C. Czech and O. Khwaja (2019). "A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, RO7034067), a SMN2 splicing modifier." *Br J Clin Pharmacol* 85(1): 181-193.

Sugarman, E. A., N. Nagan, H. Zhu, V. R. Akmaev, Z. Zhou, E. M. Rohlf, K. Flynn, B. C. Hendrickson, T. Scholl, D. A. Sirko-Osadsa and B. A. Allitto (2012). "Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens." *Eur J Hum Genet* 20(1): 27-32.

Tannoch, V. J., P. W. Hinds and L. H. Tsai (2000). "Cell cycle control." *Adv Exp Med Biol* 465: 127-140.

Tatebayashi, Y., N. Haque, Y. C. Tung, K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal (2004). "Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport." *J Cell Sci* 117(Pt 9): 1653-1663.

Tejero, R., S. Balk, J. Franco-Espin, J. Ojeda, L. Hennlein, H. Drexler, B. Dombert, J. D. Clausen, L. Torres-Benito, L. Saal-Bauernschubert, R. Blum, M. Briese, S. Appenzeller, L. Tabares and S. Jablonka (2020). "R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy." *iScience* 23(2): 100826.

Tejero, R., M. Lopez-Manzaneda, S. Arumugam and L. Tabares (2016). "Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy." *Hum Mol Genet* 25(21): 4703-4716.

Thoenen, H. and M. Sendtner (2002). "Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches." *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1046-1050.

Thomas, N. H. and V. Dubowitz (1994). "The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy." *Neuromuscul Disord* 4(5-6): 497-502.

Tsai, L. H., I. Delalle, V. S. Caviness, Jr., T. Chae and E. Harlow (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5." *Nature* 371(6496): 419-423.

Van Alstyne, M., C. M. Simon, S. P. Sardi, L. S. Shihabuddin, G. Z. Mentis and L. Pellizzoni (2018). "Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 alternative splicing underlies motor neuron death in spinal muscular atrophy." *Genes Dev* 32(15-16): 1045-1059.

Vartiainen, N., V. Keksa-Goldsteine, G. Goldsteins and J. Koistinaho (2002). "Aspirin provides cyclin-dependent kinase 5-dependent protection against subsequent hypoxia/reoxygenation damage in culture." *J Neurochem* 82(2): 329-335.

Vita, M., M. Abdel-Rehim, C. Nilsson, Z. Hassan, P. Skansen, H. Wan, L. Meurling and M. Hassan (2005). "Stability, pKa and plasma protein binding of roscovitine." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 821(1): 75-80.

Vita, M., M. Abdel-Rehim, S. Olofsson, Z. Hassan, L. Meurling, A. Siden, M. Siden, T. Pettersson and M. Hassan (2005). "Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat." *Eur J Pharm Sci* 25(1): 91-103.

Vita, M., P. Skansen, M. Hassan and M. Abdel-Rehim (2005). "Development and validation of a liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for determination of roscovitine in plasma and urine samples utilizing on-line sample preparation." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 817(2): 303-307.

Weber, J. J., L. E. Clemensson, H. B. Schioth and H. P. Nguyen (2019). "Olesoxime in neurodegenerative diseases: Scrutinising a promising drug candidate." *Biochem Pharmacol* 168: 305-318.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(5): 1858-1862.

Westenbroek, R. E., S. B. Bausch, R. C. Lin, J. E. Franck, J. L. Noebels and W. A. Catterall (1998). "Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia." *J Neurosci* 18(7): 2321-2334.

Westenbroek, R. E., L. Hoskins and W. A. Catterall (1998). "Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals." *J Neurosci* 18(16): 6319-6330.

Whittaker, S. R., R. H. Te Poele, F. Chan, S. Linardopoulos, M. I. Walton, M. D. Garrett and P. Workman (2007). "The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine; CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis." *Cell Cycle* 6(24): 3114-3131.

Wiese, S., T. Herrmann, C. Drepper, S. Jablonka, N. Funk, A. Klausmeyer, M. L. Rogers, R. Rush and M. Sendtner (2010). "Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos." *Nat Protoc* 5(1): 31-38.

Wirth, B. (2000). "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)." *Hum Mutat* 15(3): 228-237.

Wirth, B., M. Herz, A. Wetter, S. Moskau, E. Hahnen, S. Rudnik-Schoneborn, T. Wienker and K. Zerres (1999). "Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling." *Am J Hum Genet* 64(5): 1340-1356.

Wurster, C. D. and R. Gunther (2020). "[New treatments for spinal muscular atrophy]." *Nervenarzt*.

Xue, H. J., W. M. Li, Y. Li, Y. T. Gong, B. F. Yang, C. L. Jin, L. Sheng, S. Chu, L. Zhang, H. B. Shan and J. Liu (2008). "Calpain I inhibition prevents atrial structural remodeling in a canine model with atrial fibrillation." *Chin Med J (Engl)* 121(1): 32-37.

Yamada, M., T. Saito, Y. Sato, Y. Kawai, A. Sekigawa, Y. Hamazumi, A. Asada, M. Wada, H. Doi and S. I. Hisanaga (2007). "Cdk5--p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5--p35." *J Neurochem* 102(5): 1477-1487.

Yamashita, M., H. Nishio, Y. Harada, M. Matsuo and T. Yamamoto (2004). "Significant increase in the number of the SMN2 gene copies in an adult-onset Type III spinal muscular atrophy patient with homozygous deletion of the NAIP gene." *Eur Neurol* 52(2): 101-106.

Yan, Z., P. Chi, J. A. Bibb, T. A. Ryan and P. Greengard (2002). "Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons." *J Physiol* 540(Pt 3): 761-770.

Yeager, R. E., D. Yoshikami, J. Rivier, L. J. Cruz and G. P. Miljanich (1987). "Transmitter release from presynaptic terminals of electric organ: inhibition by the calcium channel antagonist omega Conus toxin." *J Neurosci* 7(8): 2390-2396.

Zerres, K. and S. Rudnik-Schoneborn (1995). "Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications." *Arch Neurol* 52(5): 518-523.

Zerres, K., S. Rudnik-Schoneborn, E. Forrest, A. Lusakowska, J. Borkowska and I. Hausmanowa-Petrusewicz (1997). "A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients." *J Neurol Sci* 146(1): 67-72.

Zhai, R. G. and H. J. Bellen (2004). "The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal." *Physiology (Bethesda)* 19: 262-270.

Zhang, R., Y. Liu, J. Zhang, Y. Zheng, X. Gu and Z. Ma (2012). "Intrathecal administration of roscovitine attenuates cancer pain and inhibits the expression of NMDA receptor 2B subunit mRNA." *Pharmacol Biochem Behav* 102(1): 139-145.

7.4 Abbildungslizenzen

Abbildung 1 aus der Publikation:

Wirth, B. (2000). "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)." *Hum Mutat* 15(3): 228-237.

Licensed Content Publication	Human Mutation
Licensed Content Title	An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)
Licensed Content Author	Brunhilde Wirth
Licensed Content Date	Feb 10, 2000
Licensed Content Volume	15
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	Der Einfluss des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine auf die Entwicklung und Differenzierung kultivierter primärer Motoneurone eines murinen Modellorganismus für spinale Muskelatrophie Typ I
Institution name	Julius Maximilians Universität Würzburg
Expected presentation date	Jul 2020
Portions	Figure 1A on page 229
Specific Languages	German
	Mr. Jan-Dierk Clausen Stephansplatz 12A

Abbildung 4 aus der Publikation:

Gurkoff, G., K. Shahlaie, B. Lyeth and R. Berman (2013). "Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury." Pharmaceuticals (Basel) 6(7): 788-812

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of all articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low Article Processing Charge (APC) for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

Abbildung 5:

Strukturformel der Enantiomere R-Roscovitine und S-Roscovitine aus dem Data Sheet von Sigma Aldrich/Merck

19 Jan 2020

COPYRIGHT CONSENT FORM¹

Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or any of its affiliates, including but not limited to EMD Millipore Corporation, Millipore SAS and Sigma-Aldrich Co. LLC (hereinafter, "Authorizer") grant permission to Jan-Dierk Clausen (hereinafter, "Requester") for the use of the photograph(s) or electronic media image(s) (hereinafter, "Works") as identified below for publication in data sheet Roscovitine (insert purpose and medium of publication (electronic, printed)).

Information on Photograph(s) and Images²:

- Image1 data sheet Roscovitine
- Image2
- Image3
- Etc.

Type of Use (check one):

- For profit
- Not for profit

1. Authorizer shall own the copyright to all Works under the terms of this consent. Requester shall have the right to make reasonable alterations or enhancements, such as cropping or retouching to any photographs without any further approval from Authorizer.
2. Requester shall in all cases when practical use the statement: "reproduced with permission from Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates".
3. Requester will ensure the Works to be stored on a safe media accessible only by the authorized representatives.
4. Authorizer may revoke this consent at any time by sending a written revocation to Requester.
5. Requester shall indemnify and hold harmless Authorizer from and against all claims, suits, losses, damages and expenses (including without limitation, court costs and attorneys fees) arising out of any and all activities of Requester.
6. The Works are in "as is/where is" condition. Authorizer does not make any representations, warranties or guarantees in connection with the Works and will not be liable for indirect/consequential damages arising out of any claim based on third party ownership to the Works.

This consent has been read and agreed by Requester on	Authorizer
Signature: <u>[Signature]</u>	Signature: <u>[Signature]</u>
Authorized Representative(s): Jan-Dierk Clausen	Authorized Representative(s): Asya Avagyan
Date: <u>29 July 2020</u>	Date: <u>10.07.2020</u>
	Signature: <u>[Signature]</u>
	Authorized Representative(s): Fidel Porcuna de la Rosa
	Date: <u>10.07.2020</u>

¹ Once completed, please send it to copyright@merckgroup.com

² Please insert information that describes the photograph or the image (Submit a photocopy or screen image of the context in which the copyrighted material will be used)



7.5 Danksagung

Liebe *Sibylle*, ich danke Dir für deine Betreuung und deinen langen Atem bis zum Abschluss des Roscovitineprojektes. Darüber hinaus danke ich Dir für viele konstruktive Gespräche und die Begleitung während meiner Zeit in Würzburg.

Lieber Herr *Prof. Sendtner*, ich danke Ihnen, dass ich meine Doktorarbeit an Ihrem Institut anfertigen durfte.

Liebe *Nicole*, vielen Dank für Deine Unterstützung von der ersten Stunde bis zum Abschluss der Experimente.

Liebe *Frau Sendtner*, vielen Dank für Ihre Unterstützung bei der Aufzucht und Auswahl der Tiere.

An meine Eltern *Anette und Manfred* und an meinen Bruder *Hinnerk*:

Vielen Dank für euren festen Glauben über die Jahre.

Ich danke euch, Mama und Papa, dass Ihr es uns ermöglicht habt, in eine so privilegierte Position zu gelangen wie wir es nun sein dürfen.

Ich danke euch für eure bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage.

Mein Vertrauen in unsere Familie und an das, was wir alles schaffen können, ist unendlich.

Publikationen

Clausen, J. D., M. Winkelmann, C. Macke, P. Mommsen, C. Krettek and S. Brand (2020). "A Rare Case of a Traumatic Posterior Hip Dislocation in a 3-Year-Old Boy: A Case Report and Review of the Literature." *Case Rep Orthop* 2020: 7560392.

Clausen, J. D., N. Nahen, H. Horstmann, F. Lasch, W. Krutsch, C. Krettek and T. S. Weber-Spickschen (2020). "Improving Maximal Strength in the Initial Postoperative Phase After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Surgery: Randomized Controlled Trial of an App-Based Serious Gaming Approach." *JMIR Serious Games* 8(1): e14282.

Harb, A., A. von Horn, K. Gocalek, L. M. Schack, J. Clausen, C. Krettek, S. Noack and C. Neunaber (2017). "Lactated Ringer-based storage solutions are equally well suited for the storage of fresh osteochondral allografts as cell culture medium-based storage solutions." *Injury* 48(7): 1302-1308.

Horstmann, H., J. D. Clausen, C. Krettek and T. S. Weber-Spickschen (2017). "[Evidence-based therapy for tendinopathy of the knee joint : Which forms of therapy are scientifically proven?]." *Unfallchirurg* 120(3): 199-204.

Krettek, C., J. Clausen, M. Omar, S. Noack and C. Neunaber (2017). "Two-stage late reconstruction with a fresh large osteochondral shell allograft transplantation (FLOCSAT) for a large osteochondral defect in a non-union after a lateral tibia plateau fracture 2-year follow up." *Injury* 48(7): 1309-1318.

Krettek, C., J. D. Clausen, N. Bruns and C. Neunaber (2017). "[Partial and complete joint transplantation with fresh osteochondral allografts-the FLOCSAT concept]." Unfallchirurg 120(11): 932-949.

Krettek, C., J. D. Clausen and C. Neunaber (2017). "[Complex joint reconstruction and joint transplantation with the FLOCSAT concept-planning and surgical implementation]." Unfallchirurg 120(11): 950-960.

Mueller, S., L. A. Kahrs, J. Gaa, T. Ortmaier, J. D. Clausen and C. Krettek (2017). "Patient specific pointer tool for corrective osteotomy: Quality of symmetry based planning and case study of ulnar reconstruction surgery." Injury 48(7): 1325-1330.

Schack, L. M., J. D. Clausen, S. Noack, A. Harb, C. Krettek and C. Neunaber (2017). "[Non-cryoconserving storage strategies for fresh osteochondral allografts]." Unfallchirurg 120(11): 918-926.

Tejero, R., S. Balk, J. Franco-Espin, J. Ojeda, L. Hennlein, H. Drexl, B. Dombert, J. D. Clausen, L. Torres-Benito, L. Saal-Bauernschubert, R. Blum, M. Briese, S. Appenzeller, L. Tabares and S. Jablonka (2020). "R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy." iScience 23(2): 100826.

Weber-Spickschen, T. S., C. Colcuc, A. Hanke, J. D. Clausen, P. A. James and H. Horstmann (2017). "Fun During Knee Rehabilitation: Feasibility and Acceptability Testing of a New Android-Based Training Device." Open Med Inform J 11: 29-36.

Winkelmann, M., C. Macke, S. Hankemeier, T. Hufner, C. Schroter, J. D. Clausen, M. Omar, C. Zeckey, C. Krettek and P. Mommsen (2016). "Connection of a hip prosthesis and an intramedullary nail as a special solution in a subtrochanteric femoral fracture with fibrous dysplasia." Technol Health Care 24(5): 729-735.

Winkelmann, M., W. Soechtig, C. Macke, C. Schroeter, J. D. Clausen, C. Zeckey, C. Krettek and P. Mommsen (2018). "Accidental hypothermia as an independent risk factor of poor neurological outcome in older multiply injured patients with severe traumatic brain injury: a matched pair analysis." Eur J Trauma Emerg Surg.

Ort, Datum

Unterschrift

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Der Einfluss des Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine auf die Entwicklung und Differenzierung kultivierter primärer Motoneurone eines murinen Modellorganismus für spinale Muskelatrophie Typ I“

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.

Weiterhin erkläre ich, dass die Regeln der Universität über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Darüber hinaus versichere ich, dass mir bis dato kein akademischer Grad entzogen wurde oder ich Gegenstand eines strafrechtlichen oder disziplinarischen Ermittlungsverfahrens bin.

Ort, Datum

Unterschrift