

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner**

**DER EINFLUSS VON R-ROSCOVITINE UND VALPROAT AUF DAS  
WACHSTUMS- UND PRÄSYNAPTISCHE DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN  
SMN-DEFIZIENTER MOTONEURONE**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Hans Henning Drexl  
aus Würzburg**

**Würzburg, April 2018**

**Referent:** Prof. Dr. med. Michael Sendtner

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. med. Kristen Rak

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 09. November 2018

**Der Promovend ist Arzt**

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| 1. Einleitung.....  | 1   |
| 1.1 Überblick über die spinale Muskelatrophie.....  | 1   |
| 1.2 Pathophysiologische Modelle für die spinale Muskelatrophie.....   | 11  |
| 1.3 Neue Therapieansätze bei der spinalen Muskelatrophie.....   | 16  |
| 1.4 R-Roscovitine.....  | 18  |
| 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....   | 22  |
| 2. Material und Methoden.....   | 24  |
| 2.1 Material.....   | 24  |
| 2.2 Methoden.....   | 29  |
| 3. Ergebnisse.....  | 36  |
| 3.1 Einfluss unterschiedlicher R-Roscovitine-Konzentrationen auf das Überleben kultivierter Motoneurone.....                          | 36  |
| 3.2 R-Roscovitine beeinflusst weder die Menge noch die Verteilung des Smn-Proteins.....   | 37  |
| 3.3 R-Roscovitine erhöht die Akkumulation von N-Typ Kalziumkanälen im Wachstumskegel Smn-defizienter Motoneurone.....                 | 41  |
| 3.4 Valproat beeinflusst weder die Menge noch die Verteilung von Smn-Protein und N-Typ Kalziumkanälen.....                            | 45  |
| 3.5 R-Roscovitine induziert eine Normalisierung der Signalintensität von $\beta$ -Aktin.....  | 51  |
| 3.6 R-Roscovitine vergrößert die Wachstumskegelfläche kultivierter Smn-defizienter Motoneurone.....                                   | 54  |
| 3.7 R-Roscovitine normalisiert das Längenwachstum der Axone Smn-defizienter Motoneurone.....  | 58  |
| 4. Diskussion.....  | 61  |
| 4.1 Einfluss von R-Roscovitine auf das Überleben kultivierter Motoneurone: kommt es zur Induktion von Apoptose?.....                  | 62  |
| 4.2 Die Normalisierung des Phänotyps Smn-defizienter kultivierter Motoneurone durch R-Roscovitine: ein kalziumabhängiger Prozess..... | 63  |
| 4.3 Valproat-Behandlung zeigt nicht die erhofften Effekte auf Smn-defiziente Motoneurone. ....  | 72  |
| 5. Zusammenfassung.....   | 78  |
| 6.1 Literaturverzeichnis.....   | 79  |
| 6.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....   | 101 |

## Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

|                     |  |
|---------------------|--|
| Abb.                | Abbildung  |
| ALS                 | Amyotrophe Lateralsklerose                         |
| ANOVA               | Analysis of variance                               |
| ASF                 | alternative splicing factor                        |
| ATP                 | Adenosintriphosphat                                |
| BDNF                | brain derived neurotrophic factor                  |
| bp                  | Basenpaare   |
| BSA                 | Bovines Serumalbumin                               |
| cAMP                | zyklisches Adenosinmonophosphat                    |
| Ca <sub>v</sub> 2.2 | 2.2-Untereinheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle |
| CB                  | coiled bodies/ Cajal bodies                        |
| CDK                 | Cyclin-abhängige Kinase                            |
| CK                  | Kreatinkinase                                      |
| CNTF                | ciliary derived neurotrophic factor                |
| CTX                 | ω-Conotoxin  |
| DMSO                | Dimethylsulfoxid                                   |
| DNA                 | desoxyribonucleic acid                             |
| dNTP                | Desoxyribonukleosidtriphosphat                     |
| EDTA                | Ethylendiamintetraessigsäure                       |
| ERK                 | Extrazellulär regulierte Kinase                    |
| ESE-site            | exon splice enhancer site                          |
| ES-Zellen           | embryonale Stammzellen                             |
| FK-228              | Romidepsin   |
| FL                  | full length-protein, vollständiges Protein         |
| FMRP                | fragiles X-mentales Retardierungs-Protein          |
| fw                  | forward  |
| GABA                | gamma-Aminobuttersäure                             |
| gems                | gemini of coiled bodies                            |
| Glutamax            | L-Alanyl-L-Glutamin                                |
| HAT                 | Histon-Acetyl-Transferase                          |
| HBSS                | Hank's balanced salt solution                      |
| HCl                 | Salzsäure  |
| HDAC                | Histon-Deacetylase                                 |

|             |   |
|-------------|---|
| HeLa-Zellen | Zelllinie aus humanem Cervixkarzinom                  |
| HEPES       | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIV         | humanes Immundefizienz-Virus                          |
| hnRNP-R     | heterogenous nuclear ribonucleoprotein R              |
| HPLC        | High-performance liquid chromatography                |
| kb          | Kilobase  |
| KCl         | Kaliumchlorid   |
| kD          | Kilodalton  |
| LPS         | Lipopolysaccharid                                     |
| LRE-site    | Leucin-Arginin-Glutamat-Motiv                         |
| MAG         | Myelin-assoziiertes Glykoprotein                      |
| MAP1B       | Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B                   |
| Mcl1        | myeloid cell leukaemia sequence 1                     |
| mRNA        | messenger ribonucleic acid                            |
| mut         | Mutante   |
| NaCl        | Natriumchlorid  |
| NB          | Neurobasal-Medium                                     |
| NF-kb       | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of B-cells  |
| n.s.        | nicht signifikant                                     |
| NSAID       | nicht-steroidales Antiphlogistikum                    |
| NSE         | Neuron-spezifische Enolase                            |
| p75-NTR     | p75-Neurotrophin-Rezeptor                             |
| PBS         | phosphate buffered saline                             |
| PC12-Zellen | Zelllinie aus dem Nebennierentumor einer Ratte        |
| PCR         | polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion  |
| PFA         | Paraformaldehyd                                       |
| PKA         | Proteinkinase A                                       |
| PKC         | Proteinkinase C                                       |
| PORN        | Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid                          |
| rev         | reverse   |
| RNA         | ribonucleic acid                                      |
| RRM         | RNA recognition motif                                 |
| SAHA        | suberoylanilide hydroxamic acid                       |
| SDS         | sodium-dodecyl-sulfate                                |

|                |  |
|----------------|--|
| SEM            | Standardfehler des Mittelwerts, Standardabweichung       |
| SF2            | splicing factor 2  |
| SIP1           | SMN Interacting Protein 1                                |
| SMA            | Spinale Muskelatrophie                                   |
| SMARD1         | spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 |
| <i>SMN</i>     | humanes survival motor neuron-Gen                        |
| <i>Smn</i>     | murines survival motor neuron-Gen                        |
| SMN            | humanes survival motor neuron-Protein                    |
| <i>Smn</i>     | murines survival motor neuron-Protein                    |
| SMN $\Delta$ 7 | trunkiertes SMN-Protein ohne Exon 7                      |
| SP             | single photon  |
| Tab.           | Tabelle  |
| TAE            | Tris-acetat-EDTA   |
| TBS-T          | Tris-buffered saline mit Tween                           |
| TNF $\alpha$   | Tumornekrosefaktor $\alpha$                              |
| TR             | trunkiertes, unvollständiges Protein                     |
| TRIS           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                         |
| TSA            | Trichostatin A   |
| TTX            | Tetrodotoxin   |
| Tween-20       | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat                         |
| U-snRNP        | Uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein             |
| VGCC           | spannungsabhängiger Kalziumkanal                         |
| VPA            | Valproat   |
| wt             | Wildtyp  |
| ZBP            | zipcode binding protein                                  |
| ZNS            | zentrales Nervensystem                                   |

# **1. Einleitung**

## ***1.1 Überblick über die spinale Muskelatrophie***

Neurodegenerative Erkrankungen sind eine große Gruppe von meist schweren Krankheiten, die ein breites Spektrum klinischer Symptome zeigen. Den degenerativen Motoneuronenerkrankungen liegt ein Untergang motorischer Nervenzellen zu Grunde. Beide Ebenen der motorischen Bahn können betroffen sein. Da sich die Symptomatik nach Ort der Schädigung stark unterscheidet, unterteilt man in Erkrankungen des ersten, des zweiten und beider Motoneurone.

Die einerseits aufgrund ihrer relativen Häufigkeit und andererseits durch prominente Erkrankte wie den kürzlich verstorbenen Physiker Stephen Hawking wohl bekannteste degenerative Motoneuronenerkrankung ist sicherlich die amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Sie betrifft beide Motoneurone, weswegen es in ihrem Verlauf zu einer Kombination aus schlaffen, atrophischen und spastischen Lähmungen kommt.

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine Erkrankung ausschließlich des zweiten Motoneurons. Im Folgenden wird ein Überblick über ihr klinisches Erscheinungsbild, bislang bekannte genetische, molekularbiologische und pathophysiologische Grundlagen und vorhandene Tiermodelle gegeben.

### **1.1.1 Klinische Erscheinungsbilder der spinalen Muskelatrophie**

Um 1890 wurde von den Neurologen Guido Werdnig und Johann Hoffmann eine „Muskeldystrophie mit positiven Rückenmarks-Befunden“ beschrieben und erstmals der Begriff der spinalen Muskelatrophie geprägt. Die Arbeiten der beiden Ärzte beschrieben das Krankheitsbild der akuten infantilen SMA und erklärten es mit in Autopsien beobachteten makroskopischen und mikroskopischen Defekten an den Vorderhörnern des Rückenmarks. Sie konnten beispielsweise eine Verdünnung der Vorderwurzeln und eine Abnahme der Motoneuronzahl nachweisen (Iannaccone, 1998). Als Ursache der Erkrankung erkannten sie den Verlust von unteren Alpha-Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks.

Der klinische Verlauf wird durch eine teils rasch progrediente, proximal betonte symmetrische Muskelschwäche bis hin zur Paralyse und Muskelatrophie charakterisiert. Wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen können als



mögliches Frühsymptom Muskelfaszikulationen auftreten. Die Muskeleigenreflexe erlöschen im Verlauf der Erkrankung. Sekundär können Skelettanomalien wie beispielsweise eine Skoliose oder Hyperlordose sowie Kontrakturen auftreten (Arnold et al., 2015). Die Sensibilität ist üblicherweise nicht beeinträchtigt, vereinzelt wurde jedoch vor allem bei schweren Verlaufsformen auch eine Herabsetzung der Nervenleitgeschwindigkeit und axonale Degeneration sensibler Neurone beobachtet (Anagnostou et al., 2005; Rudnik-Schöneborn et al., 2003). Beteiligungen des vegetativen Nervensystems sowie Beeinträchtigungen von Intelligenz und geistiger Entwicklung kommen nicht vor.

Bei den kindlichen spinalen Muskelatrophien werden anhand des Erkrankungsalters, erreichten motorischen Fähigkeiten und klinischem Verlauf vier Hauptformen unterschieden.

| Form | Beginn (Lebensmonat) | motorische Meilensteine | Tod (Jahre)      |
|------|----------------------|-------------------------|------------------|
| 0    | intrauterin          | keine                   | postnatal        |
| I    | < 3                  | nie freies Sitzen       | < 2              |
| II   | < 12                 | nie freies Gehen        | > 2              |
| III  | > 18                 | freies Stehen und Gehen | Erwachsenenalter |

**Tabelle 1:** Klassifikation der kindlichen Formen der SMA (nach Munsat und Davies, 1996)

Typ 0 stellt eine seltene Sonderform mit besonders schwerem Verlauf dar. Erkrankte Kinder zeigen bereits intrauterin verminderte fetale Bewegungen und sterben kurz nach der Geburt aufgrund massiver Ateminsuffizienz (Dubowitz, 1999).

Die SMA Typ I (Werdnig-Hoffmann) beginnt im frühen Säuglingsalter. Die Kinder sind per definitionem nicht befähigt, das freie Sitzen zu erlernen. Der Verlauf ist rasch progredient und zeigt das Bild einer ausgeprägten generalisierten Muskelschwäche, der Tod tritt meist innerhalb der ersten zwei Jahre durch Ateminsuffizienz oder Infektionen des Respirationstrakts ein.

Kinder mit SMA Typ II (chronische infantile SMA oder intermediäre SMA) erkranken später, jedoch auch innerhalb des ersten Lebensjahrs. Sie können sich aufrichten und frei sitzen, das Gehen ohne Unterstützung ist ihnen jedoch nicht möglich. Die Lebenserwartung ist nicht so drastisch reduziert wie bei Kindern mit SMA Typ I.

Eine mildere Form der Erkrankung ist Typ III (Kugelberg-Welander, juvenile SMA). Die Diagnose kann schon im Alter von ungefähr einem Jahr gestellt werden oder erst im späteren Jugendalter. Die Betroffenen erkranken erst nach dem 18. Lebensmonat und entwickeln sich bis dahin motorisch unauffällig, d.h. sie können frei stehen und laufen. Klinisch zeigt sich eine proximal betonte Muskelschwäche. Die Progression der Erkrankung erweist sich als sehr variabel, die Lebenserwartung der Patienten ist zumindest nicht deutlich reduziert. Allerdings sind sie später in aller Regel auf den Rollstuhl angewiesen (Munsat und Davies, 1992; Frugier et al., 2002).

Darüber hinaus wird noch ein Typ IV abgegrenzt, welcher sich erst im Erwachsenenalter manifestiert, große Variabilität hinsichtlich des klinischen Verlaufes zeigt und genetische Unterschiede zu den juvenilen Formen besitzt (Pearn et al., 1978; Brahe et al., 1995; Clermont et al., 1995; Zerres et al., 1995). Die Lebenserwartung dieser Patienten ist nicht beeinträchtigt.

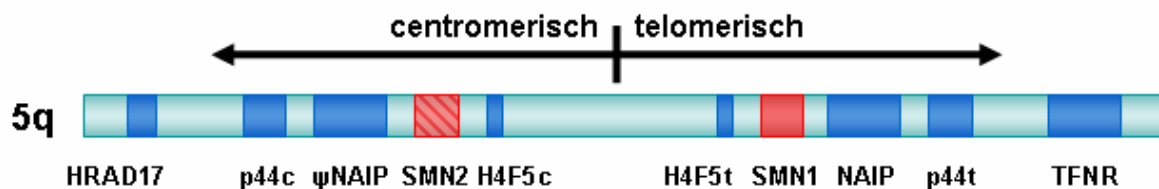
Neben diesen klassischen Typen der SMA existieren noch zahlreiche andere, seltene Sonderformen, die nicht auf Defekte im *SMN1*-Gen auf Chromosom 5q zurückzuführen sind (siehe unten). Diese weisen unterschiedliche Symptome und Vererbungsmodi auf. Als Beispiel sei hier die SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1) genannt, welche mit einer akut lebensbedrohlichen Ateminsuffizienz durch Zwerchfelllähmung einhergehen kann (Grohmann et al., 2001).

### **1.1.2 Genetische Grundlagen der SMA beim Menschen**

Die proximale SMA mit Mutation des *SMN1*-Gens wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Heterozygotenfrequenz liegt bei etwa 1:50, die Krankheit selbst weist eine Häufigkeit von etwa 1:8.000 - 10.000 Geburten auf (Pearn, 1973; Pearn et al., 1978). Somit ist sie neben der zystischen Fibrose eine der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten tödlich verlaufenden Erkrankungen bei Kindern.

Auslöser der Krankheit ist ein Defekt des *survival motor neuron*-Gens (*SMN*-Gen). Es ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q13) lokalisiert, hat eine Größe von ca. 1,7 Kilobasen (kb), besteht aus 294 Aminosäuren und hat eine Molekulargewicht von 38 kD. Es beinhaltet neun Exone (Exon 1, 2a, 2b, 3-8) sowie acht Introne (Gilliam et al., 1990; Melki et al., 1990, Lefebvre et al., 1995). Eine Besonderheit bei Primaten stellt die Duplikation der chromosomalen Region um das *SMN*-Gen herum

dar. Hierdurch liegen neben den *SMN*-Genen 1 und 2 drei weitere Gene in zwei Kopien vor: *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), *basal transcription factor subunit p44* und *H4F5* (Lefebvre et al., 1995; Roy et al., 1995; Bürglen et al., 1997; Carter et al., 1997; Scharf et al., 1998; Übersichtsartikel: Wirth, 2000). Vermutlich ist das *SMN2*-Gen als intrachromosomale Duplikation des *SMN1*-Gens entstanden (Schmutz et al., 2004).

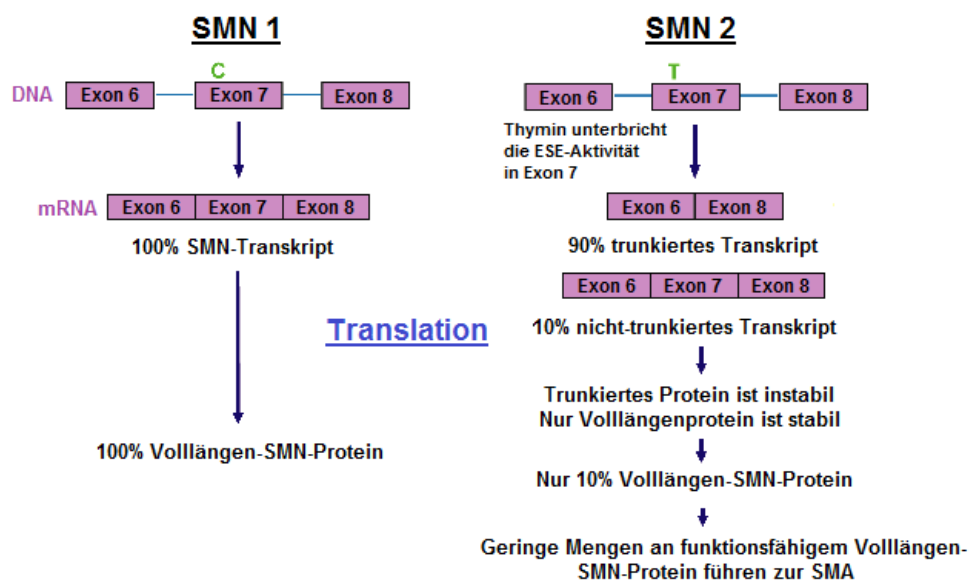


**Abbildung 1:** Darstellung der *SMN*-Region auf Chromosom 5q13. Das *SMN*-Gen ist Teil einer duplizierten Genregion und liegt daher in zwei Versionen vor: als telomerisch gelegenes *SMN1*-Gen (rot) und als centromerisch gelegenes *SMN2*-Gen (rot schraffiert). Außer dem *SMN*-Gen befinden sich innerhalb der duplizierten Region drei weitere Gene: *H4F5*, *NAIP* und *p44*. Bei einigen Patienten mit SMA können auch in diesen Genen Mutationen gefunden werden (nach Wirth, 2000).

Das telomer gelegene *SMN1*-Gen (*SMNt*) und das zentromer gelegene *SMN2*-Gen (*SMNc*) sind zum allergrößten Teil identisch, sie unterscheiden sich in nur fünf Nukleotiden (Bürglen et al., 1996) auf jedoch entscheidende Weise. Durch Austausch des sechsten Nukleotids im kodierenden Bereich von Exon 7 des *SMN2*-Gens (Codon 280) von Cytosin zu Thymin kommt es zu einem alternativen Spleiß-Prozess, der beim Großteil der *SMN2*-Transkripte zu einem Verlust der Exon 7-kodierten Regionen und somit zu einem verkürzten Genprodukt (*SMNΔEx7*) führt (Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999). Somit wird das *SMN2*-Gen nur zu etwa 10% in ein vollständiges und funktionsfähiges *SMN*-Protein (full length *SMN*, FL *SMN*) translatiert, die übrigen Genprodukte sind defekt und instabil (truncated *SMN*, TR *SMN*) (Lorson und Androphy, 2000).

Ursache der SMA ist der Verlust des *SMN1*-Gens, welcher durch das vorhandene *SMN2*-Gen aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Defekte der vom *SMN2*-Gen kodierten Proteine nicht kompensiert werden kann (Lefebvre et al., 1995). Zum Verlust des *SMN1*-Gens führen zumeist Deletionen ganzer Abschnitte des Gens durch nicht-homologe Rekombinationen während der Meiose, seltener sind "einfache" Mutationen in diesem Bereich zu beobachten (Hahnen et al., 1995; Brahe et al., 1996, Wirth et al., 1999; Skordis et al., 2001; Monani et al., 2003; Übersichtsartikel: Jablonka und Sendtner, 2003).

Der SMA liegt ein klassischer Gendosis-Effekt zugrunde (Burghes, 1997; Campbell et al., 1997; DiDonato et al., 1997; Parsons et al., 1998; Vitali et al., 1999; Prior et al., 2004; Yamashita et al., 2004; Cuscó et al., 2006; Wirth et al., 2006; Übersichtsartikel: Wirth, 2000). Je höher die Anzahl der *SMN2*-Genkopien bei einem Patienten, desto mehr Voll-Längen *SMN*-Transkript und funktionstüchtiges *SMN*-Protein wird gebildet. Dies führt zu einem späteren Erkrankungsbeginn sowie einem langsameren Verlauf der Krankheit mit abgeschwächten Symptomen. 80 % der Typ I SMA-Patienten tragen eine oder zwei Kopien des *SMN2*-Gens, wohingegen 96 % der Typ III-Patienten drei oder mehr Kopien besitzen. Dies kommt durch unterschiedliche Mutationen zustande, die zum Defekt des *SMN1*-Gens führen: Patienten mit SMA Typ I weisen mehrheitlich einen vollständigen Funktionsverlust des *SMN1*-Gens auf, während bei Patienten mit SMA Typ II oder III häufig eine Konversion des *SMN1*- zum *SMN2*-Gen zu beobachten ist. Abbildung 2 zeigt schematisch die genomische Situation des *SMN*-Lokus beim Gesunden und beim SMA-Patienten sowie die Veränderungen von Translation, Transkription und Proteinmenge.



**Abbildung 2:** *SMN1* wird zu 100% in das intakte Protein (beinhaltet die Exone 6-7-8) translatiert. Bei *SMN2* wird aufgrund einer Punktmutation (Cytosin - Thymin) zu 90% eine um das Exon 7 verkürzte Form (6-8) gebildet. Die Instabilität des trunkierten Proteins und die geringen Mengen an intaktem Protein führen durch Fehlen des *SMN1*-Gens zu einer deutlich herabgesetzten Menge an SMN-Protein bei Patienten mit SMA (nach Monani et al., 2000).

### 1.1.3 Tiermodelle der SMA

Um die Auswirkungen des *SMN*-Gendefekts zu untersuchen, wurde eine Reihe von Zellkulturmodellen bei Invertebraten, Zebrafischen und Mäusen entwickelt. Bei allen diesen Spezies kommt das *SMN*-Gen nur in einer Kopie vor. Die Duplikation des *SMN*-Gens ist evolutionsgeschichtlich ein spätes Ereignis und findet sich nur bei Primaten, das durch alternatives Spleißen in ein trunkiertes Protein übersetzte *SMN2*-Gen trägt sogar ausschließlich der Mensch (Rochette et al. 2001).

Bei der Hefe *Saccharomyces pombe* wird SMN als YAB8 bezeichnet (Hannus et al., 2000). Dieses Protein hat Homologie mit dem humanen SMN-Protein im N- und C-Terminus (Owen et al., 2000; Paushkin et al., 2000), es fehlt jedoch die interne TUDOR-Domäne für die RNA-Bindung (Talbot et al., 1997); daher ist dieses Modell für die Erforschung der Pathophysiologie der spinalen Muskelatrophie nur bedingt geeignet.

Beim Spulwurm *Caenorhabditis elegans* findet man ein *Smn*-Gen, das für ein Protein mit 207 Aminosäuren kodiert, inklusive einer TUDOR-Domäne (Talbot et al., 1997; Schmid et al., 2007). Dieses Protein ist im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert. Ähnlich wie bei Vertebraten wird auch bei *C. elegans* das *Smn*-Gen in allen Entwicklungsstadien vor allem im Nervensystem sehr hoch exprimiert (Miguel-Aliaga et al., 1999). Die Depletion des Gens führt zu Entwicklungsstörungen, insbesondere aber zu neuronalen Defekten, unkoordinierten Bewegungen und einem reduzierten Muskeltonus, ähnlich einer Motoneuronerkrankung bei Vertebraten (Miguel-Aliaga et al., 1999; Schmid et al., 2007; Briese et al., 2009).

Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gibt es ebenfalls ein einziges *Smn*-Ortholog, das für ein Protein mit 226 Aminosäuren kodiert (Chan et al., 2003; Schmid et al., 2007). Das *Smn*-Gen wird in den Eizellen der Fliegen sehr hoch exprimiert, so dass bei entsprechenden Knockoutmodellen sehr viele maternale Transkripte bzw. Proteine bis weit in die Embryonalentwicklung etwa 14 Stunden nach Eiablage zur Verfügung stehen (Chan et al., 2003). Homozygote mutante Larven entwickeln sich in den ersten 12 Stunden normal, zeigen dann aber eine reduzierte Mobilität und unkoordinierte Bewegungen. Dies erscheint auch insofern bemerkenswert, da Motoneurone in der Fliege Glutamat als Neurotransmitter verwenden, im Gegensatz zu Acetylcholin bei Vertebraten. Dieses Fliegenmodell wurde intensiv für

Untersuchungen zur zellulären Funktion verwendet. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass das Fehlen von Smn-Protein das Spleißen von Vorläufer-mRNAs beeinflusst, allerdings nicht über den „major splice complex“ mit U1- und U2-Spleißosomen, sondern vor allem über den von U11 und U12 abhängigen „minor splice complex“ (Lotti et al., 2012; Imlach et al., 2012). Allerdings wird dieser „minor splice complex“ während der Entwicklung erst relativ spät aktiviert und die ursprünglichen Arbeiten hierzu aus dem Labor von Livio Pellizzoni wurden durch Daten von Greg Matera in Frage gestellt, die belegten, dass die Defekte im Spleißen von Transkripten über den „minor splice complex“ nur deshalb nicht stattfinden, weil sich Smn-defiziente Fliegen verzögert entwickeln und die Prozessierung von pre-mRNAs über den „minor splice complex“ noch gar nicht in dem Entwicklungsstadium abläuft, im dem die Fliegenlarven durch Imlach und Kollegen sowie Lotti und Kollegen untersucht wurden (Garcia et al., 2013). Auf jeden Fall findet man bei Smn-defizienten Fliegen auch Störungen in der Entwicklung spinaler Netzwerke, insbesondere beim Aufbau synaptischer Verbindungen zwischen propriozeptiven Nervenzellen und Motoneuron-Zellkörpern (Chan et al., 2003). Ob diese primär durch eine Fehlfunktion von Smn in propriozeptiven sensorischen Neuronen bedingt sind oder indirekt als Folge von Störungen der Motoneuronen zustande kommen, ist bisher ungeklärt. Auf jeden Fall weisen diese Arbeiten darauf hin, dass das Fehlen des *Smn*-Gens bzw. des Smn-Proteins bereits zu sehr frühen Störungen in der Entwicklung führen kann, die nicht nur die Neurotransmission an der neuromuskulären Endplatte betreffen, sondern auch die Entwicklung von spinalen Netzwerken für die Motorik.

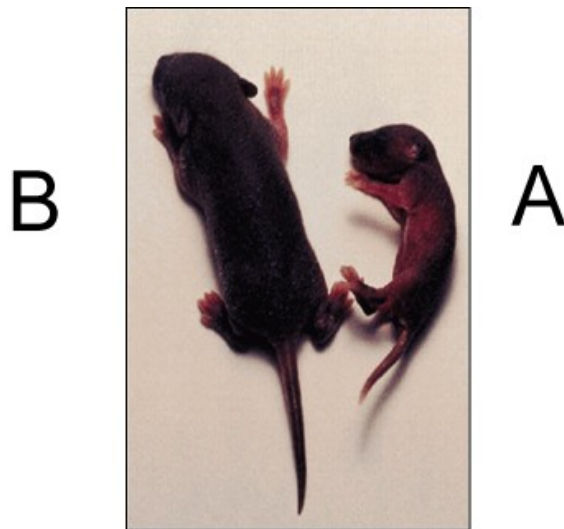
Auch Zebrafischmodelle wurden intensiv für Untersuchungen zur Pathophysiologie der SMA verwendet. Das Zebrafischmodell eignet sich insbesondere für Untersuchungen zur Entwicklung axonaler Verbindungen während der Entwicklung, da diese Fische in ihren Entwicklungsstadien transparent sind. Hierdurch sind fluoreszierende bzw. immunhistochemisch gefärbte Axone leicht zu identifizieren, was morphologische und funktionelle Analysen sehr erleichtert. Wenn Smn über die Morpholino-Technik temporär in der Frühphase der neuronalen Entwicklung supprimiert wird, führt das zu massiven Störungen im Axonwachstum, wenngleich nicht zu einer Abnahme der Anzahl an Motoneuronen (McWhorter et al., 2003). Motorische Axone sind verkürzt und abnormal verzweigt. Die Axone erreichen nicht

ihre Ziele in der Muskulatur und die Zahl der von den Axonausläufern korrekt erreichten neuromuskulären Endplatten ist herabgesetzt (McWhorter et al., 2003). Als Folge zeigen die Fische schwere Störungen in der Motorik. Einen vergleichbaren Phänotyp findet man auch bei genetischen Modellen, in denen das *Smn*-Gen und nicht nur das Transkript ausgeschaltet ist. Zusätzlich wurde ein Zebrafisch-Modell hergestellt, bei dem das *Smn*-Gen des Fisches homozygot deaktiviert und das humane *SMN2*-Gen ins Genom eingebracht wurde (Hao et al., 2011). Bei diesen Fischen waren ebenfalls gestörtes axonales Wachstum und schwere motorische Störungen zu beobachten. Interessanterweise konnten die Defekte durch eine Anhebung der SMN-Proteinmenge beseitigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ausreichende Mengen an SMN-Protein in der Wachstumsphase der Axone für eine korrekte Entwicklung der neuromuskulären Endplatten erforderlich sind (McWhorter et al., 2003; Hao et al., 2011; Hao et al., 2013).

Auch bei Mäusen existiert lediglich ein einziges *Smn*-Gen. Es befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 13. Dieses Gen und die davon kodierte Aminosäuresequenz entsprechen dem menschlichen Gen und Protein zu 81% bzw. 82% (DiDonato et al., 1997; Viollet et al., 1997). Zur Erforschung der SMA wurden verschiedene Mausmodelle erzeugt.

Eine homozygote Ausschaltung beider *Smn*-Allele (*Smn*<sup>-/-</sup>) führt nach Verbrauch des maternalen *Smn*-Proteins aus der Oozyte zum Absterben des Keims im frühen Blastozystenstadium durch apoptotische Zelluntergänge. Somit ist das *Smn*-Protein offensichtlich von entscheidender Bedeutung für das zelluläre Überleben (Schrank et al., 1997). Dieses Problem kann jedoch durch Einbringen von zwei Kopien des humanen *SMN2*-Gens überwunden werden. Es wurden auf dieser Basis zwei Mausmodelle entwickelt, bei denen ausschließlich das *SMN2*-Gen bzw. der überwiegende Teil der beim Menschen duplizierten Genregion inklusive des *SERF1*-Gens und einem Teil des *NAIP*-Gens auf einen *Smn*<sup>-/-</sup>-Hintergrund eingebracht wurden (Monani et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000). Hierdurch wird in diesen Mäusen etwa 10-30% der normalen Menge an *Smn*-Protein hergestellt. Die Lebenserwartung dieser Mäuse beträgt nur maximal eine Woche nach der Geburt. Ihre Gewebe weisen entsprechend denen von Patienten mit SMA Typ I eine stark reduzierte Gesamtmenge an *Smn*-Protein auf. Phänotypisch zeigen die Mäuse sofort nach der Geburt verminderte Bewegungen, generelle Schwäche und eine Atrophie der

Interkostalmuskulatur. Sie saugen weniger und sind deutlich kleiner und leichter als gesunde Geschwistertiere, wie Abbildung 3 eindrücklich zeigt.



**Abbildung 3:** Vier Tage altes *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2* („low copy“)-Jungtier (A) und gesundes Geschwistertier, welches zumindest ein normales *Smn*-Allel besitzt (B). Die betroffene Maus zeigt typische phänotypische Charakteristika wie Reduktion von Körpergröße und -gewicht, Schwäche, herabgesetzte Beweglichkeit und Unfähigkeit, sich selbst aufzurichten (Monani et al., 2000).

Innerhalb der Lebensspanne dieser *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Mäuse gehen gegenüber Wildtypen nur etwa 20% der Motoneurone verloren. In der Zellkultur weisen aus solchen Mäusen isolierte Motoneurone im Vergleich zu wildtypischen Zellen deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten auf. Auffällig sind vor allem kürzere Axone, verkleinerte Wachstumskegel und eine verringerte Menge an  $\beta$ -Aktin-mRNA und -Protein im distalen Axon (Rossoll et al., 2002; Rossoll et al., 2003). Insgesamt kommt dieses Mausmodell somit der SMA Typ I sowohl vom klinischen Verlauf, als auch von histologischen und molekularen Befunden recht nahe (Monani et al., 2000). Dahingegen zeigen Mäuse mit knockout des murinen *Smn*-Gens und acht eingebrachten *SMN2*-Kopien („high copy“) keine klinischen Auffälligkeiten, auch die SMN-Proteinmenge ist verglichen mit Kontrolltieren normal (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Dies bestätigt den beschriebenen Gendosis-Effekt als Korrelation zwischen der Kopienanzahl für das transgene humane *SMN2*-Gen, der Gesamtmenge an SMN-Protein und dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung (Burghes 1997).



Zur Erforschung der milderen Formen der SMA wurden weitere Mausmodelle erzeugt.

Das zusätzliche Einbringen eines *Smn*-Transgens mit einer Deletion des Exon 7 (*SMNΔ7*) auf einem *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Hintergrund erhöht das Überleben der Tiere auf etwa zwei Wochen nach der Geburt (Le et al., 2005). Ab dem zweiten bis fünften Tag postpartal zeigen diese Tiere typische Krankheitszeichen wie verminderte Bewegungen und muskuläre Atrophie, einhergehend mit histologischen Befunden wie Verlust von spinalen Motoneuronen sowie - deutlich auffälliger - eine gestörte Entwicklung der Präsynapsen mit kleinen, degenerierten Axonen und denervierten neuromuskulären Endplatten (Kariya et al., 2008).

Ein weiteres Mausmodell der SMA besitzt neben dem humanen *SMN2*-Gen eine hemizygot, punktmutierte Form des murinen *Smn*-Gens (Mutation in Exon 1, A2G Missense Mutation) auf dem *Smn*<sup>-/-</sup>-Hintergrund (Monani et al., 2003). Phänotypisch zeigen diese Tiere einen milderen Verlauf der Erkrankung mit einer Lebenserwartung von etwa acht Monaten. Der Verlust an Motoneuronen verläuft langsamer und man kann ein typisches Aussprossen zusätzlicher kompensatorischer Axone an den Axonterminalen beobachten. Diese Mäuse werden anhand des klinischen Verlaufs der SMA Typ II bis III zugeordnet.

Eine heterozygote Inaktivierung des *Smn*-Gens (*Smn*<sup>+/-</sup>) führt bei sechs Monate alten Mäusen zu einer etwa 46%-igen Reduktion der *Smn*-Proteinmenge im Rückenmark (Jablonka et al., 2000) ohne Abnahme der Anzahl der als Gemini of coiled bodies (Gems) bezeichneten *Smn*-immunreaktiven Strukturen im Zellkern. Die Anzahl der spinalen Motoneurone ist hingegen deutlich reduziert, bis zum Alter von einem Jahr gehen insgesamt 50% der Motoneurone verloren. Auch diese Mäuse sind in der Lage, ihre Muskelkraft aufgrund zusätzlicher aussprossender Axone an den Axonterminalen, die funktionstüchtige Endplatten ausbilden, weitestgehend aufrecht zu erhalten (Simon et al., 2010). Auch die Lebenserwartung ist nicht vermindert. Diese Krankheitsentwicklung lässt sich mit späten Formen der SMA beim Menschen (Typ Kugelberg-Welander) vergleichen (Jablonka et al. 2000).

Zur Untersuchung des Effekts des gewebespezifischen *Smn*-Verlusts schaltete eine französische Arbeitsgruppe durch konditionalen Knockout mittels des Cre-LoxP-Systems das Exon 7 des *Smn*-Gens nur in neuronalen Geweben aus, in allen anderen blieben beide Allele des *Smn*-Gens erhalten. Hierbei führt die Cre-

Expression unter Kontrolle des NSE-Promotors (Neuron-spezifische Enolase) ausschließlich in Neuronen zur homozygoten Deletion des Exon 7 des *Smn*-Gens (Frugier et al., 2000). Diese Mäuse weisen motorische Defekte und eine reduzierte Lebenserwartung auf. Histologisch ist die Zahl der Motoneurone herabgesetzt, die Muskelfasern zeigen Anzeichen von Denervierung und sind atrophisch. Darüber hinaus wurden ein vollständiges Fehlen von Smn-immunreaktiven Gemini of coiled bodies, eine gestörte Bildung von Cajal bodies sowie eine Anreicherung von Neurofilamenten in Wachstumskegeln beobachtet. Auch eine selektive Verminderung der Smn-Proteinmenge führt also zur Beeinträchtigung der Funktion von Motoneuronen (Frugier et al., 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2002; Monani et al., 2000; Übersichtsartikel: Jablonka und Sendtner, 2017).

Insgesamt lassen sich die unterschiedlichen Verläufe der SMA anhand zahlreicher unterschiedlicher Tiermodelle recht gut nachstellen. Die Ergebnisse legen nahe, dass das Absterben der Motoneurone an sich nicht das entscheidende pathophysiologische Geschehen ist, sondern dass es sich hierbei vielmehr um strukturelle Störungen beim Auswachsen der Axone sowie im Bereich der Präsynapse und der neuromuskulären Endplatte handeln muss.

## ***1.2 Pathophysiologische Modelle für die spinale Muskelatrophie***

### **1.2.1 Funktion des SMN-Proteins im spleißosomalen Komplex**

Kurz nach der Entdeckung des *SMN1*-Gendefekts als Ursache der spinalen Muskelatrophie wurde bekannt, dass das korrespondierende SMN-Protein zentraler Bestandteil eines Komplexes ist, der inzwischen als SMN-Komplex bezeichnet wird (Liu et al., 1997; Gubitz et al., 2004) und für die Assemblierung spleißosomaler snRNP-Partikel verantwortlich ist. Der Komplex ist in der Nähe des Zellkerns im Zytosol lokalisiert und wirkt wie ein großes Chaperon für die Assemblierung spleißosomaler kleiner RNAs (U1, U2) mit spleißosomalen Sm-Proteinen (Fischer et al., 1997; Pellizoni et al., 1998; Pellizoni et al., 2002). Die fertigen Spleißosomen werden dann weiter prozessiert und in den Zellkern zurücktransportiert, wo sie eine zentrale Rolle bei der Prozessierung von Vorläufer-mRNAs spielen (Meister et al., 2002). Danach werden die Spleißosomen im Zellkern regeneriert und auch hierbei scheint das SMN-Protein eine Rolle zu spielen. Zumindest ist es in Strukturen in der Nachbarschaft von „coiled bodies“ lokalisiert, den sogenannten „gemini of coiled

bodies“ (Gems), in denen diese Regeneration stattfinden könnte (Liu und Dreyfuss 1996; Liu et al., 1997; Malatesta et al., 2004). Die Prozessierung von Vorläufer-mRNAs ist für alle Zelltypen essentiell, nicht nur für Motoneurone. Aus diesem Grund zeigen Mäuse, die kein Smn-Protein exprimieren können, bereits in frühesten Entwicklungsstadien - noch bevor das Blastozystenstadium erreicht wird - massive Degenerationszeichen, können sich nicht weiterentwickeln und sterben ab (Schrack et al., 1997). Wenn das menschliche *SMN2*-Gen in mindestens zwei Kopien als Transgen exprimiert wird, entwickeln sich die Mäuse bis zur Geburt, zeigen dann jedoch typische Krankheitszeichen einer schweren SMA (Monani et al., 2000). Bei solchen Mausmodellen wurde auch untersucht, ob die Prozessierung von Vorläufer-mRNAs verändert ist. Die Befunde diesbezüglich erscheinen jedoch relativ geringfügig. Die Mengen an totaler mRNA und RNA in solchen Mausembryonen sind vor und auch nach der Geburt fast unverändert (Jablonka et al., 2000). Weitere Untersuchungen, die sich hauptsächlich auf Transkripte für den „minor splice complex“ (U12-abhängig) fokussierten, fanden zwar signifikante, aber doch nur mild ausgeprägte Defekte (Doktor et al., 2017), so dass es derzeit eher unwahrscheinlich scheint, dass diese Defekte tatsächlich für das Krankheitsbild der SMA verantwortlich sind. Es wirkt auch nicht schlüssig, dass ein schwerwiegender Defekt in einem für alle Zellarten wesentlichen Prozess sich phänomenologisch fast ausschließlich in Motoneuronen manifestiert. Nichts desto weniger finden sich aber auch Hinweise auf eine Relevanz fehlerhaft gespleißter Proteine in der Pathophysiologie der SMA. Unter den fehl-gespleißten Transkripten sind vor allem mRNAs für spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCCs), aber auch das Transkript für das „Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1“ (UBA-1). Dieses Protein kann unter anderem mit dem Smn-Protein selbst interagieren. Bei Smn-defizienten Mäusen ist die subzelluläre Verteilung von UBA-1 gestört, auch in Motoneuronen. Suppression von UBA-1 im Zebrafisch führt ebenfalls zu einer der SMA ähnlichen Form von Motoneuronenerkrankung (Wishart et al., 2014). Diese Daten weisen darauf hin, dass Defekte in der Prozessierung der Vorläufer-mRNA für UBA-1 im Verbund mit einer gestörten Interaktion von UBA-1 mit Smn aufgrund des Mangels an Smn-Protein zu funktionellen Störungen führen können, die zum Krankheitsbild der spinalen Muskelatrophie beitragen. Tatsächlich ist beta-Catenin ein Substrat für die Ubiquitinierung durch UBA-1 und die Mengen an beta-Catenin in Mausmodellen für

die SMA sind deutlich erhöht (Wishart et al., 2014). Wenn beta-Catenin in Mausmodellen für die SMA pharmakologisch inhibiert wird, verbessern sich die neuromuskuläre Pathologien und die synaptische Übertragung. Aus diesem Grund könnte verändertes Spleißen von Transkripten tatsächlich zur Pathophysiologie der spinalen Muskelatrophie beitragen.

Die SMN-Expression in unterschiedlichen Geweben unterscheidet sich stark nach Typ und Entwicklungsstadium, die höchsten Proteinmengen lassen sich in fetalen Geweben nachweisen (Burllet et al., 1998; Jablonka et al., 2000). Insbesondere die Motoneurone des Rückenmarks beinhalten hohe SMN-Mengen (Battaglia et al., 1997). Entsprechend dem im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Gendosis-Effekt ist die Gesamtmenge an SMN in allen untersuchten Geweben von Patienten mit SMA deutlich reduziert, vor allem im Rückenmark (Coovert et al., 1997; Wirth et al., 2000). Entsprechend Genetik und klinischem Schweregrad ist auch der Verlust von SMN-Protein bei Patienten mit SMA Typ I größer als bei Typ II oder III (Coovert et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). Regulationsstörungen der Genexpression können als Ursache für die beobachteten Unterschiede in der Proteinmenge weitestgehend ausgeschlossen werden, da beide Proteine über identische Promotorsequenzen und -aktivitäten verfügen (Echaniz-Laguna et al., 1999; Monani et al., 1999).

### **1.2.2 SMN-Funktionen, die nicht mit Spleißen von mRNA assoziiert sind**

In Motoneuronen lässt sich das SMN-Protein nicht nur im Zytoplasma des Zellkörpers und im Zellkern, sondern auch in punktförmigen Ansammlungen entlang der Dendriten und Axone sowie in den axonalen Wachstumskegeln nachweisen (Béchade et al., 1999; Pagliardini et al., 2000; Fan und Simard, 2002; Zhang et al., 2003). Zudem zeigte sich, dass in frühen Stadien der Embryonalentwicklung vor allem der Zellkern der Motoneurone reichlich SMN enthält, während später stärkere Anreicherungen im Zellsoma und in den Axonen nachweisbar sind (Giavizzi et al., 2006). Das trunkierte SMN-Protein findet sich hingegen ausschließlich im Zellkern; offenbar ist die korrekte Lokalisation des Proteins von einer Sequenz im deletierten Abschnitt des Proteins abhängig. Solche Motoneurone zeigen ein um 25% verkürztes Neuritenwachstum (Wang und Dreyfuss, 2001; Rossoll et al., 2003). Der Transport des SMN-Proteins erfolgt über längere Strecken Mikrotubuli-abhängig, bei Kurzstrecken wird Aktin benötigt (Zhang et al., 2003). Aus diesen Ergebnissen lässt

sich ableiten, dass das SMN-Protein offensichtlich axonal aktiv transportiert wird und eine Rolle für das Wachstum von Neuriten spielt.

Sowohl in Zebrafischmodellen als auch in Zellkulturmodellen von Motoneuronen aus Mäusen mit reduzierter Smn-Expression steht die axonale Degeneration der Motoneurone im Vordergrund. Während das Überleben der Motoneurone im Wesentlichen nicht verändert ist, sind die Axone verkürzt, axonale Wachstumskegel sind wesentlich kleiner, enthalten weniger Aktinfilamente (Rossoll 2003; Jablonka et al., 2007) und in Zellkultur fällt insbesondere eine gestörte Assemblierung von Komponenten der präsynaptischen aktiven Zone auf (Jablonka et al., 2007). Dies konnte vor allem durch eine gestörte Assemblierung bzw. Kolokalisierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und den präsynaptischen Proteinen Piccolo und Bassoon gezeigt werden (Jablonka et al., 2007; Tejero et al., 2016). Dieser Defekt korreliert mit Störungen der synaptischen Neurotransmission an neuromuskulären Endplatten und kann durch verändertes Spleißen von Vorläufer-mRNAs für diese Komponenten nicht zufriedenstellend erklärt werden. Daraus und aus der Verteilungsstörung des am C-Terminus trunkierten SMN2-Proteins wurde abgeleitet, dass das SMN-Protein weitere Funktionen besitzen muss, die insbesondere für Axone von Motoneuronen bzw. Axonterminalen und den darin enthaltenen präsynaptischen aktiven Zonen von großer Relevanz sind. Unterstützung bekam diese Hypothese durch Untersuchungen an isolierten Smn-defizienten Motoneuronen in kompartimentierten Zellkultur-Systemen, in denen RNA sowohl aus dem axonalen als auch aus dem somatodendritischen Kompartiment isoliert werden konnte (Saal et al., 2014). In diesen Untersuchungen zeigen sich massive Defekte in der Verteilung spezifischer mRNAs, vor allem im Axon. Im somatodendritischen Kompartiment sind Komponenten für den MHC-1-Komplex sowie Transkripte für Spleißfaktoren hochreguliert (Saal et al., 2014). Diese neuronale Hochregulation von MHC-1-Komponenten ist typisch für viele neurodegenerative Erkrankungen und wird als Bestandteil adaptiver Prozesse angesehen, die zur Aktivierung von Mikroglia und anderen nicht-neuronalen Zellen führen und vor allem die Stabilität von synaptischen Verbindungen modulieren können. Auch die Hochregulation von Spleißfaktoren erscheint interessant, da sie möglicherweise Veränderungen in den „splice patterns“ bei Transkripten verursachen könnten, ohne dass solche Veränderungen auf eine reduzierte Aktivität von U1- oder

U12-Spleißosomen zurückzuführen sind. Vor allem aber haben diese Untersuchungen Veränderungen im axonalen Transkriptom nachgewiesen, insbesondere für Transkripte, die für Bestandteile des Zytoskeletts, wie beispielsweise Aktin, oder andere Komponenten der präsynaptischen aktiven Zone kodieren (Saal et al., 2014). Zur Herstellung und Aufrechterhaltung einer funktionierenden neuromuskulären Endplatte spielt ein intaktes Zytoskelett eine entscheidende Rolle, wobei Aktin-Isoformen hier als wesentliche Bausteine fungieren (Moradi et al., 2017). Als neuronale Besonderheit werden mRNAs - beispielsweise für die unterschiedlichen Aktin-Isoformen - durch das Axon in die Präsynapse transportiert und dort vor Ort translatiert. Die oben genannten Ergebnisse legen nahe, dass der Mangel an SMN-Protein Störungen im axonalen Transport verursacht und dass dies einen wichtigen pathogenetischen Faktor bei der SMA darstellt. SMN bindet selbst zwar keine mRNAs, könnte jedoch für die Funktion von klassischen RNA-Bindungsproteinen wie hnRNP-R, TDP-43, HuD, FUS, Senataxin und anderen eine Rolle spielen, da es mit diesen Faktoren interagiert (Rossoll et al., 2002; Fallini et al., 2011; Yamazaki et al., 2012; Tsuiji et al., 2013; Fallini et al., 2014; Zhao et al., 2016). Diese Proteine sind bei der RNA-Prozessierung und als Teil des SMN-Komplexes unbedeutend. Sie sind jedoch Teil eines SMN-Proteinkomplexes, der bei Verarbeitung von prä-mRNAs und deren intrazellulären Transport, insbesondere eben beim axonalen Transport, von Relevanz ist.

### **1.2.3 Defekte Assemblierung präsynaptischer aktiver Zonen bei spinaler**

#### **Muskelatrophie**

Die Übertragungsstörungen an neuromuskulären Endplatten sowie morphologische Veränderungen an Synapsen sind zentrale Komponenten der Pathologie der SMA. Bereits 2003 konnte belegt werden, dass die axonale Translokation von  $\beta$ -Aktin bei Motoneuronen aus Smn-defizienten Mäusen massiv gestört ist und dass diese Veränderungen für Defekte in der Aktin-Assemblierung bedeutsam sein könnten (Rossoll et al., 2003). Tatsächlich zeigten jüngste Untersuchungen, dass nicht nur die Menge an mRNA für  $\beta$ -Aktin, sondern auch für  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Aktin deutlich in Axonen von Smn-defizienten Motoneuronen reduziert ist (Moradi et al., 2017). Üblicherweise führt ein Mangel an einer der drei Aktin-Formen zur Hochregulation der beiden

anderen, um die Gesamtmenge an Aktin konstant und die Polymerisation des Zytoskeletts weiterhin aufrechterhalten zu können. Diese Kompensation ist in den Smn-defizienten Motoneuronen offenbar nicht möglich. Aktindynamik spielt eine wichtige Rolle für die Funktion präsynaptischer aktiver Zonen, auch in anderen Modellen für Motoneuronerkrankungen. So konnten beispielsweise in Motoneuronmodellen für die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) nach Depletion von C9orf72 massive Veränderungen in der Aktindynamik festgestellt werden (Sivadasan et al., 2016), was sowohl auf die Endozytose als auch für den Transfer und die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran Auswirkungen haben könnte. So kann beispielsweise der BDNF-Rezeptor Trk-B nur über Myosin-6 endozytiert werden; diese Myosin-6-vermittelte Endozytose ist abhängig von Aktin (Yano et al., 2006). Es ist also zu vermuten, dass die Endozytose von „signaling endosomes“ nach Aktivierung des Trk-B-Rezeptors von BDNF bei Smn-defizienten Motoneuronen gestört ist. Ebenso ist es möglich, dass die Rezirkulierung dieses Rezeptors, die ebenfalls Aktin-abhängig ist, bei Smn-defizienten Motoneuronen verändert ist. Dies hätte Auswirkungen auf aktive Zonen und ihre Aufrechterhaltung. Obwohl diese Hypothese bisher nicht bewiesen ist, zeigen Befunde zu Plastin-3, einem Protein, das das Verhältnis von F- zu G-Aktin modifiziert (Oprea et al., 2008; Ackermann et al., 2013; Hosseinibarkooie et al., 2016) und so den SMA-Phänotyp modulieren kann, auf den Gehalt dieser Hypothese hin. Veränderte Aktindynamik wurde auch bei Zebrafischmodellen nach Depletion von Smn gefunden. Aus diesen Untersuchungen ergeben sich auch Hinweise auf neue Therapieansätze, z.B. durch Modulatoren des Rapamycin/mTor-Signalwegs, um die lokale Proteinsynthese in Axonterminalen maximal zu stimulieren oder durch Befunde, dass eine Überexpression von Phosphatase und Tensin homolog (PTEN) Defekte in präsynaptischen Terminalen bei Smn-defizienten Motoneuronen (Ning et al., 2010) kompensieren kann.

### ***1.3 Neue Therapieansätze bei der spinalen Muskelatrophie***

Aufgrund der Beobachtung eines relativ geringen Verlusts an spinalen Motoneuronen bei der SMA bei stark ausgeprägten klinischen Befunden wurde ein „dying back“-Pathomechanismus postuliert, bei welchem eine sich retrograd zu den Zellkörpern im

Rückenmark fortpflanzende Störung im Bereich der neuromuskulären Endplatte vorliegt (Monani et al., 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008). Das Ausbleiben kalziumabhängiger Differenzierungssignale auf dem Boden der gestörten Architektur des Zytoskeletts der Wachstumskegel und dem damit einhergehenden fehlerhaften Clustering spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Jablonka et al., 2007; Tejero et al., 2016) ist vermutlich ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der SMA, da das Ausbleiben dieser Differenzierungssignale zu Reifungsstörungen der neuromuskulären Synapse und letztendlich aufgrund fehlender rückwärts gerichteter Überlebenssignale zur Apoptose der Motoneurone führen könnte.

Genetische und zellbiologische Untersuchungen bei Patienten und Patientenzellen sowie in Tiermodellen haben bewiesen, dass das *SMN2*-Gen beim Menschen nach Ausfall des *SMN1*-Gens den Phänotyp nur zum Teil kompensieren kann, weil es nicht in der Lage ist, genügend Transkripte mit Inklusion der Exon7-kodierten Sequenzen zu liefern, um ausreichend vollständig biologisch aktives SMN-Protein zu generieren. Nur in wenigen Fällen, in denen die Zahl der *SMN2*-Genkopien auf meist mehr als 4 Kopien erhöht ist, erscheinen betroffene Individuen gesund. Auch bei Mausmodellen konnte diese genetische Konstellation nachgestellt werden. Verantwortlich für den Phänotyp ist die Transition im Exon7 des *SMN2*-Gens, wodurch sowohl eine „splice acceptor site“ zerstört wird, als auch ein „splice inhibitor“ aktiviert wird. Dieser Befund hat den Weg geebnet zu neuen therapeutischen Ansätzen mit auf Antisense-Nukleotiden basierenden Molekülen, die den intronischen „splice silencer“ N1 modulieren (Hua et al. 2010). Diese Moleküle gehen auf die 2-O-Metoxylethyl-2-MOE-Technologie zurück, mit der solche Antisense-Oligonukleotide stabilisiert werden können. Sie haben inzwischen erfolgreich alle Phasen von Tierversuchen bis zu klinischen Studien der Phase III durchlaufen und wurden kürzlich durch die FDA und die europäischen Behörden für die Behandlung von Patienten unter dem Namen Spinraza® zugelassen. Dieses neue Medikament muss regelmäßig intrathekal bei Patienten mit SMA Typ I appliziert werden. Allerdings ist noch nicht klar, ob zum Zeitpunkt der Diagnose einer SMA die Motoneurone und deren Axone bzw. deren Axonterminalen bereits derartig verändert sind, dass eine Erhöhung der SMN-Expression über diesen Antisense-medierten Ansatz eine Regeneration bewirken kann. Darüber hinaus ist es möglich, dass spinale Schaltkreise, die bei der SMA ebenfalls pathologisch verändert sind, nicht

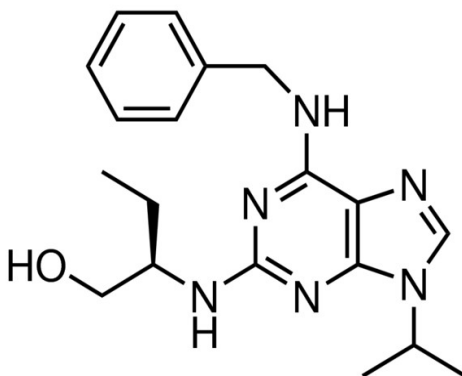


mehr durch diese Erhöhung der SMN-Konzentration über den Antisense-Oligonukleotid-Ansatz korrigiert werden können. Da zumindest in den Mausmodellen der Übertragungsdefekt an der neuromuskulären Endplatte im Mittelpunkt steht, erscheint es deshalb von zentralem Interesse, zusätzliche symptomatische Therapien zu entwickeln, die die Funktion der präsynaptischen aktiven Zone stärken, den Defekt in der Assemblierung von Kalziumkanälen kompensieren und so für eine verbesserte Neurotransmission an den neuromuskulären Endplatten sorgen. Hierdurch könnte zumindest eine zentrale Stelle der Pathophysiologie durch entsprechende Moleküle so modifiziert werden, dass die Hochregulation von SMN in betroffenen Motoneuronen bei Patienten mit SMA ihre maximale Wirkung entfalten kann (Jablonka und Sendtner 2017, Review). Als eine hierfür in Frage kommende Substanz erscheint R-Roscovitine.

## 1.4 R-Roscovitine

### 1.4.1 Chemische Grundlagen

R-Roscovitine (Synonyme: Seliciclib™, CYC202) ist ein C2,N6,N9-trisubstituiertes Purinderivat mit einem Molekulargewicht von 354,5. Es ist in Chloroform und DMSO löslich. Der systematische chemische Name lautet 2-(R)-[[9-(1-Methylethyl)-6-[(phenylmethyl)amino]-9H-purin-2-yl]amino]-1-butanol,6-(Benzylamino)-2(R)[[1(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropylpurine, die chemische Summenformel  $C_{19}H_{26}N_6O$ . Abbildung 4 zeigt das R-Roscovitine-Molekül.



**Abbildung 4:** Chemische Struktur von R-Roscovitine (Merck/Sigma-Aldrich)

### **1.4.2 Molekulare Wirkungen**

R-Roscovitine besitzt zwei offenbar voneinander unabhängige Wirkungen: einerseits eine Inhibition Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs), andererseits eine verlangsamte Deaktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen.

R-Roscovitine wirkt als hochselektiver Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, insbesondere von CDK2 und CDK5 (Meijer et al, 1997). Andere CDKs werden hingegen allenfalls gering gehemmt. Bach und Kollegen berichteten zusätzlich über Inhibition der CDKs 1, 7 und 9 (Bach et al., 2005). Als weitere Zielenzyme konnten die extracellular regulated kinases ERK1 und ERK2 gefunden werden. Es wurden insgesamt 25 (Meijer) bzw. 151 (Bach) hoch aufgereinigte Kinasen getestet, darunter die Proteinkinasen A, G und C, die Myosin-Leichtkettenkinase sowie Tyrosin-Rezeptorkinasen. Nur ein weiteres Zielmolekül von R-Roscovitine, nämlich die die Phosphorylierung und Aktivierung von Vitamin B<sub>6</sub> katalysierende Pyridoxalkinase, konnte hierbei identifiziert werden (Bach et al., 2005). Ursächlich ist eine Interaktion von R-Roscovitine mit der Bindungsstelle des Enzyms für Pyridoxal.

Eine Beeinflussung des Zellzyklus konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Meijer und Kollegen zeigten, dass durch Behandlung mit R-Roscovitine der Zellzyklus an mehreren Angriffspunkten reversibel gehemmt wird (Meijer et al, 1997). Dieser Effekt konnte auch bei CDK2-depletierten Zellen nachgewiesen werden (Bach et al., 2005). Da die CDK2 ein wesentliches Target von R-Roscovitine darstellt, existieren möglicherweise noch weitere, bis jetzt unbekannte Wirkungen auf den Zellzyklus. Zumindest konnte eine Beeinflussung des Überlebens und der Apoptose von Zellen bewiesen werden. So führt R-Roscovitine-Behandlung durch komplexe Eingriffe in inflammatorische Signalkaskaden wie Inhibition der NF- $\kappa$ b-Aktivierung und vermehrte ERK-Aktivierung unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  und LPS zu erhöhten Apoptoseraten bei neutrophile Granulozyten (Leitch et al., 2010). Im Gegenzug konnte jedoch auch ein antiapoptotischer Effekt von R-Roscovitine bei postmitotischen Motoneuronen gezeigt werden, bei denen die Apoptose durch Entzug neurotropher Faktoren induziert wurde (Appert-Collin et al., 2006).

Ein Effekt von R-Roscovitine auf Kalziumkanäle wurde erstmals 2002 beschrieben (Yan et al., 2002). Es wurde eine Verlangsamung der Deaktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle vom P/Q-Typ sowie auch vom N-Typ nachgewiesen

(Buraei et al., 2005; DeStefino et al., 2010). Olomoucine, ein mit R-Roscovitine strukturell verwandter CDK-Inhibitor, zeigte keine Wirkung auf Kalziumkanäle (Buraei et al., 2005). Weitere Anhaltspunkte legen nahe, dass dieser Effekt unabhängig von der CDK-Inhibition zu sein scheint: Einerseits trat er bei intrazellulärer R-Roscovitine-Applikation nicht auf, was auf eine extrazelluläre Bindungsstelle hinweist, andererseits konnte er auch bei p35-defizienten Neuronen, dem neuronenspezifischen Aktivator für CDK5, nachgewiesen werden (Yan et al., 2002). In Nervenzellen sind CDK5 und p35 bei der Organisation des neuronalen Zytoskeletts, beim Auswachsen von Neuriten und bei der Gehirnentwicklung von Bedeutung (Tsai et al., 1994; Nikolic et al., 1996; Ohshima et al., 1996; Chae et al., 1997; Smith et al., 2001). S-Roscovitine besitzt die gleichen CDK-inhibierenden Eigenschaften wie R-Roscovitine, wohingegen sich in mehreren Untersuchungen keine Anhaltspunkte für eine modulierende Wirkung auf spannungsabhängige Kalziumkanäle durch S-Roscovitine ergeben haben (Meijer et al., 1997; Cho und Meriney 2006; Buraei et al., 2005; Buraei et al., 2007; Buraei und Elmslie, 2008). Gegen eine Beteiligung der CDKs spricht außerdem der schnelle Wirkungseintritt von weniger als zwei Sekunden. Der Mechanismus der Wechselwirkung von R-Roscovitine mit spannungsabhängigen Kalziumkanälen scheint eine direkte Interaktion der beiden Partner in geöffnetem Zustand der Kalziumkanäle zu sein (Buraei et al., 2005). 2008 gelang der Nachweis eines zusätzlichen antagonistischen Effekts auf  $Ca_v2$ -Kanäle. Dieser ist jedoch klar vom Agonismus abzugrenzen, da er später eintritt und höhere Konzentrationen von R-Roscovitine erfordert (Buraei und Elmslie, 2008). Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist ebenfalls unabhängig von der CDK-Inhibition und wird über eine Überführung der Kalziumkanäle in den inaktiven Zustand vermittelt.

### **1.4.3 Aktueller Einsatz in Forschung und Klinik**

Die unterschiedlichen Wirkungen von R-Roscovitine sind Gegenstand intensiver Forschung.

Die Beeinflussung des Zellzyklus und die unter bestimmten Voraussetzungen beschriebenen proapoptotischen Wirkungen machen R-Roscovitine zu einem potentiellen Therapeutikum für Tumorerkrankungen. So konnten in zahlreichen Experimenten hemmende Wirkungen auf kultivierte Tumorzellen nachgewiesen

werden. R-Roscovitine scheint hierbei an mehreren Punkten in den Zellzyklus einzugreifen: durch Herunterregulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, Stimulation des Tumorsuppressorproteins p53 sowie Inhibition der RNA-Polymerase-II-abhängigen Transkription (Dey et al., 2008). Letzteres führt zur herabgesetzten Expression des antiapoptotischen Proteins myeloid cell leukaemia sequence 1 (Mcl1) und somit zur Apoptose. Zudem wurden antitumoröse Wirkungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei menschlichen Brustkrebszellen gefunden. Eine Kombination von R-Roscovitine mit ionisierender Strahlung führt zu Strahlensensibilisierung und verminderter Angiogenese bei verminderter Verfügbarkeit endothelialer Wachstumsfaktoren, diese Kombination scheint zudem synergistische Effekte zu haben (Maggiorella et al., 2003; Maggiorella et al., 2009). R-Roscovitine wird in klinischen Studien als Krebsmedikament, unter anderem auch in der Therapie chronisch lymphatischer Leukämien getestet (Hahntow et al., 2004; Rogalinska et al., 2010).

Bei Mäusen wurden zudem antiinflammatorische Effekte von R-Roscovitine nachgewiesen (Rossi et al., 2006). Behandlung mit R-Roscovitine beschleunigt die Auflösung medikamentös erzeugter Entzündungen durch Steigerung der Apoptoseraten proinflammatorischer Zellen.

Bukanov und Kollegen gelang 2006 die erfolgreiche Therapie von Mausmodellen für polyzystische Nierenerkrankungen (Bukanov et al., 2006). Auch diese Erkrankung scheint durch Störungen des Zellzyklus ausgelöst zu werden. Durch stoßweise Applikation von R-Roscovitine konnte das Fortschreiten der Krankheit aufgehalten werden. Als molekulare Mechanismen erwiesen sich der Arrest des Zellzyklus und die Inhibition der Transkription.

Ein weiterer klinischer Effekt von R-Roscovitine ist die Verhinderung des Auftretens bzw. die Aufhebung einer bereits eingetretenen Morphintoleranz bei Ratten. Dies wird offensichtlich durch Beeinflussung eines CDK5-abhängigen Signalweges vermittelt, ein direkter analgesierender Effekt von R-Roscovitine konnte nicht nachgewiesen werden (Parkitna et al., 2006). Der genaue Mechanismus dieser Wirkung ist jedoch bislang nicht bekannt.

CDK-Inhibitoren werden außerdem als vielversprechender neuartiger pharmakologischer Ansatz in der antiretroviralen Therapie untersucht. Ein bemerkenswerter Vorteil gegenüber den verfügbaren Substanzklassen ist in diesem Zusammenhang, dass bislang keine Resistenzbildung von HI-Viren gegenüber CDK-

Inhibitoren beobachtet wurde. Als potentester HIV-Hemmstoff erwies sich der CDK2-Inhibitor Alsterpaullone, in Kombination mit R-Roscovitine konnten allerdings noch bessere Ergebnisse erzielt werden (Guendel et al, 2010).

### **1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Angesichts der im Vorangegangenen beschriebenen pathologischen Veränderungen Smn-defizienter Motoneurone liegt die Vermutung nahe, dass das Ausbleiben eines kalziumabhängigen Differenzierungssignals einen „dying back“-Mechanismus auslöst und dass dies den entscheidenden Faktor in der Pathogenese der SMA darstellt. In diesem Fall müsste sich bei isolierten Smn-defizienten Motoneuronen über die Wiederherstellung von Erregbarkeit und Funktion der Präsynapse durch die Erhöhung des Kalziumeinstroms ein normalisierter Phänotyp herstellen lassen.

Ziel der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war es daher, das Wachstumsverhalten von aus *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Mäusen (Monani et al., 2000) gewonnenen isolierten Motoneuronen, die mit dem Kalziumkanalagonisten R-Roscovitine behandelt wurden, mit dem von wildtypischen Zellen zu vergleichen. Als Matrixprotein für die Zellkultur wurde das synapsenspezifische Laminin-221 gewählt, da dessen Interaktion mit spannungsabhängigen Kalziumkanälen im Bereich der Wachstumskegeln kultivierter Motoneurone sehr gut beschrieben ist (Nishimune et al., 2004; Jablonka et al., 2007).

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen näher beleuchtet:

1. Hat die Behandlung mit R-Roscovitine Auswirkungen auf das Überleben der isolierten Motoneurone? Welche Konzentrationen von R-Roscovitine im Medium sind für die folgenden Experimente geeignet?
2. Beeinflusst R-Roscovitine die Expression oder die intrazelluläre Verteilung von Smn-Protein? Führt die Behandlung mit R-Roscovitine zu einer Veränderung in der Akkumulation der für die Differenzierung der Wachstumskegel wichtigen Akkumulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle? Wie vergleichen sich diese Wirkungen mit denen von Valproat (VPA), das als HDAC-Inhibitor unspezifisch die Transkription des *SMN2*-Gens positiv modulieren kann?

3. Führt die Behandlung mit R-Roscovitine zu Veränderungen in der Architektur der Präsynapse? Zur Beantwortung dieser Frage soll das Augenmerk besonders auf die Konzentration und intrazelluläre Verteilung von  $\beta$ -Aktin und von N-Typ-Kalziumkanälen liegen.
4. Wie wirkt sich die Behandlung mit R-Roscovitine auf das Wachstumsverhalten der Motoneurone aus? Hierzu sollen insbesondere Messungen der Wachstumskegel sowie der Axonlängen Aufschluss geben.

Im Rahmen der Arbeit soll getestet werden, ob und wie R-Roscovitine auf die Funktion der präsynaptischen spannungsabhängigen Kalziumkanäle wirkt und ob dieser Effekt geeignet ist, um spezifisch in den Pathomechanismus der SMA einzugreifen. Im Vergleich dazu soll der Effekt von Valproat untersucht werden. Valproat wurde seit 2003 wiederholt als Kandidat für eine Therapie der SMA vorgeschlagen. Dieses Medikament stimuliert als Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC) relativ unspezifisch die Transkription des *SMN2*-Gens (Brichta et al., 2003). Auf Valproat wurden große Hoffnungen als potentiell Therapeutikum gesetzt (Weihl et al., 2006; Hahnen et al., 2006; Hauke et al., 2009). Allerdings bestätigten sich diese Erwartungen in klinischen Studien an SMA-Patienten bislang nicht (Kissel et al., 2011; Swoboda et al., 2010; Krosschell et al., 2018). Deshalb wurden im Rahmen der Arbeit auch die Effekte von Valproat auf die krankheitsbedingt veränderten intrazellulären Strukturen in *Smn*-defizienten Motoneuronen mit besonderem Augenmerk auf die Präsynapse untersucht. Um die Effekte auf die Präsynapse besser beurteilen zu können, wurde auch für diese Experimente das synapsenspezifische Laminin-221 als Matrixprotein für die Zellkultur gewählt. Insbesondere sollten die Expression und intrazelluläre Verteilung von N-Typ-Kalziumkanälen und *Smn*-Protein bei mit R-Roscovitine und mit VPA behandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen untersucht und verglichen werden.

Diese Untersuchungen an isolierten embryonalen *Smn*-defizienten Motoneuronen sollen einerseits weiter zum Verständnis der Pathophysiologie der SMA beitragen, andererseits mögliche Wege zur Entwicklung neuer Therapien für diese Erkrankung aufzeigen.

## **2. Material und Methoden**

### ***2.1 Material***

#### **2.1.1 Technische Geräte**

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Elektrophorese-Kammer           | PeqLab   |
| Konfokale Mikroskope            | Leica TCS 4D<br>Leica TCS single photon 2 (SP2)  |
| PCR-Cycler                      | Mastercycler, Eppendorf AG   |
| Photometer                      | BioPhotometer, Eppendorf AG  |
| Schüttler                       | Thermomixer comfort, Eppendorf AG  |
| UV-Transilluminator             | INTAS Classic-Box  |
| Zentrifugen                     | Centrifuge 5417R, Eppendorf AG<br>miniSpin, Eppendorf AG<br>Biofuge® fresco/ Heraeus Instruments |
| Inkubator                       | Heraeus Thermo Hera cell 240   |
| Neubauer-Zählkammer             | Marienfeld   |
| Binokulares Operationsmikroskop | Leica MZ75   |

#### **2.1.2 Mauslinie $Smn^{-/-};SMN2$**

$Smn^{-/-};SMN2$  („low copy“) auf FVB-Hintergrund (Monani et al., 2000).

#### **2.1.3 Medien, Puffer, Lösungen und Zusätze**

Zur Einstellung von pH-Werten wurde HCl bzw. NaOH verwendet.

#### **Zellkultur**

##### Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

|  |               |
|--|---------------|
| B27-Supplement   | Gibco         |
| Borsäure   | Merck         |
| DMSO   | Gibco         |
| Hank's balanced salt solution (HBSS)                             | Gibco         |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure<br>(HEPES) | Sigma-Aldrich |

|  |                     |
|--|---------------------|
| Horse Serum (hitzeinaktiviertes Pferdeserum)       | Linaris             |
| Kaliumchlorid (KCl)                                | Merck               |
| L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamax)                     | Gibco               |
| Purified Human Merosin (Laminin-221)               | Chemicon Europe     |
| MLR3-Antikörper                                    | Rogers et al., 2006 |
| Natriumacetat                                      | Merck               |
| Natriumchlorid (NaCl)                              | Merck               |
| Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) | Merck               |
| Neurobasal (NB)                                    | Gibco               |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)                    | Linaris             |
| Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid (PORN)                | Sigma-Aldrich       |
| R-Roscovitine                                      | Calbiochem          |
| Trypsin  | Worthington         |
| Trypsin-Inhibitor                                  | Linaris             |
| Valproat   | Sigma-Aldrich       |

#### Herstellung der verwendeten Reagenzien

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Motoneuron-Medium (50 ml)    | 5 ml Horse-Serum, 1 ml B27-Supplement,<br>500 µM Glutamax, 44 ml Neurobasal         |
| Boratpuffer                  | 0.15 M Borsäure, aqua bidest., pH 8.35,<br>autoklavieren, steril filtrieren         |
| Depolarisationslösung        | 30 mM KCl, 137 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> ,<br>aqua bidest., steril filtrieren |
| 100xPORN                     | 500 mg Poly-DL-Ornithin Hydrobromid, 10 ml<br>Borat-Puffer (0.15 M, pH 8.35)        |
| 1xPORN                       | 500 µl 100x PORN, 50 ml Borat-Puffer  |
| 1M HEPES-Lösung              | 1M HEPES, Aqua bidest., pH 7.3, steril<br>filtrieren                                |
| 1%iges Trypsin               | 1% Trypsin-Pulver, 25 mM 1 M HEPES-<br>Lösung, HBSS                                 |
| 0,1%iger Trypsin-Inhibitor   | 1% Trypsin-Inhibitor, 20 mM 1 M HEPES-<br>Lösung, HBSS                              |
| Merosin (Laminin 211)-Lösung | 2,5 µg/ml Laminin-211, HBSS   |



## Neurotrophe Faktoren

|      |   |
|------|---|
| BDNF | Chemicon Europe   |
| CNTF | Institut für klinische Neurobiologie,<br>Universität Würzburg |

## **Immunzytochemie**

### Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

|   |               |
|---|---------------|
| Aceton                                      | J. T. Baker   |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                  | Sigma-Aldrich |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat          | Merck         |
| Glycerin                                    | Merck         |
| Mowiol                                      | Sigma-Aldrich |
| Natriumacetat                               | Merck         |
| Natriumchlorid (NaCl)                       | Merck         |
| Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat          | Merck         |
| Paraformaldehyd (PFA)                       | Merck         |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)             | Linaris       |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)       | Merck         |
| Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) | Sigma-Aldrich |

### Herstellung der verwendeten Reagenzien

|                 |  |
|-----------------|--|
| 1x TBS-T        | TRIS-buffered Saline mit Tween<br>20 mM TRIS-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20,<br>pH 7.6  |
| 4 % PFA-Lösung  | 40 g PFA, 500 ml aqua bidest., 1 NaOH-Plätzchen;<br>auf 60°C erwärmen, pH auf 7.4 einstellen, 410 ml<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.2 M) und 90 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.2 M)<br>zugeben, filtrieren |
| Mowiol-Präparat | 10 g Mowiol, 40 ml PBS (pH 8.0), 20 ml Glycerin<br>(wasserfrei); 24 Stunden bei 60°C rühren  |

## Antikörper und Farbstoffe

| <b>Primärantikörper</b>                      | <b>Verdünnung</b> | <b>Typ, Herkunft</b>  | <b>Referenz</b>              |
|--|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| β-Aktin                                      | 1:500             | monoklonal, Maus      | Biozol                       |
| N-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanal<br>α1b-Subunit | 1:200             | polyklonal, Kaninchen | Sigma-Aldrich                |
| Smn  | 1:250             | monoklonal, Maus      | Transduction<br>Laboratories |
| tau  | 1:1000            | polyklonal, Kaninchen | Sigma-Aldrich                |

**Tabelle 2a:** Für die Immunzytochemie verwendete Primärantikörper

| <b>Sekundärantikörper</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Typ</b>                 | <b>Referenz</b> |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------|
| Cy-2                      | 1:200             | monoklonal, anti-Maus      | Dianova         |
| Cy-2                      | 1:200             | polyklonal, anti-Kaninchen | Dianova         |
| Cy-3                      | 1:300             | monoklonal, anti-Maus      | Dianova         |
| Cy-3                      | 1:300             | polyklonal, anti-Kaninchen | Dianova         |

**Tabelle 2b:** Für die Immunzytochemie verwendete Sekundärantikörper

Alle sekundären Antikörper wurden in Ziegen hergestellt.

| <b>Farbstoff</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Referenz</b> |
|------------------|-------------------|-----------------|
| DAPI             | 1:1000            | Sigma-Aldrich   |

**Tabelle 2c:** Verwendeter Farbstoff

## **DNA-Isolierung, PCR und Gelelektrophorese**

### Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

|                                     |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Agarose                             | Invitrogen              |
| Betain 5 M                          | Sigma-Aldrich           |
| Bromphenolblau                      | Sigma-Aldrich           |
| Chelex                              | Sigma-Aldrich           |
| dATP, dTTP, dCTP, dGTP (dNTPs)      | MBI Fermentas           |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich           |
| Essigsäure, glacial                 | Mallinckrodt Baker B.V. |
| Ethidiumbromid                      | Merck                   |

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| 5xFS-Puffer                           | Invitrogen    |
| Glycerin                              | Merck         |
| HPLC-Wasser                           | Merck         |
| Natriumchlorid (NaCl)                 | Merck         |
| Primer                                | Invitrogen    |
| Proteinase K                          | Roche         |
| Sarcosyl                              | Sigma-Aldrich |
| Taq-Polymerase                        | Biotherm      |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) | Merck         |
| Xylencyanol                           | Sigma-Aldrich |
| 10xPuffer                             | Biotherm      |

#### Herstellung der verwendeten Reagenzien

|              |   |
|--------------|---|
| EDTA-Lösung  | 0.5 M EDTA, aqua dest., pH 8.0  |
| Lysispuffer  | 2.5 ml 10% Sarcosyl, 1 ml 5M NaCl,<br>2.5 g Chelex, ad 50 ml aqua bidest.                     |
| 50xTAE       | 242 g (2 mol) TRIS, 60 g (1 mol) Essigsäure,<br>100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0, ad 2l aqua bidest. |
| 1xTAE        | 0.04 M TRIS·CH <sub>3</sub> COOH, 0.01 M EDTA, pH 8.0   |
| 6xLadepuffer | 30% Glycerin, 0,25% Xylencyanol, 0,25%<br>Bromphenolblau in 1xTAE                             |

#### Oligonukleotidsequenzen für die PCR

|                     |   |
|---------------------|---|
| SMN ko (GMS 11)     | 5' – GAT GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT G – 3'     |
| SMN wt (MSMN 11)    | 5' – CAA CTT TCC ACT GTT TCA AGG GAG TTG – 3'   |
| SMN sense (GNA 3ab) | 5' – CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CCT G – 3' |

#### Molekulargewichtstandards für doppelsträngige DNA

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus

Bezugsquelle: MBI Fermentas

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Präparation des Rückenmarks**

Der Tag post conceptionem wurde bei Nachweis eines vaginalen Pfropfs als erster Tag (E 1) der Embryonalentwicklung angesehen. Am vierzehnten Tag (E 14) wurden der trächtigen Maus nach Narkose und Euthanasie durch zervikale Dislokation die beiden Hörner der Gebärmutter in einem Stück entnommen. Die Embryonen wurden einzeln aus dem Uterus und den umgebenden Fruchthüllen herauspräpariert. Der Kopf wurde abgetrennt, gründlich in Aqua bidest. gereinigt und zu einem Viertel zur Genotypisierung in 200 µl Lysispuffer eingelegt. Das lumbale Rückenmark wurde unter dem Operationsmikroskop freipräpariert und in einem Stück entnommen. Es wurde von der Dura mater und den anhängenden Spinalganglien befreit und in mit jeweils 180 µl HBSS gefüllte Eppendorf-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden die so präparierten Gewebe auf Eis gekühlt und zur Anlage einer Motoneuronzellkultur weiterverarbeitet.

### **2.2.2 Motoneuronzellkultur**

Zur Auflösung des festen Gewebeverbands des Rückenmarks wurde jedes der Eppendorf-Röhrchen mit präpariertem Rückenmark für 15 Minuten bei 37°C mit 20 µl 1%-igem Trypsin in  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS behandelt. Das Rückenmark wurde danach in ein neues Röhrchen mit 180 µl HBSS überführt und der Trypsinverdau durch Zugabe von 20 µl 0,1%-igem Trypsin-Inhibitor gestoppt. Mittels vorsichtiger Trituration wurde aus dem zusammenhängenden Gewebe eine homogene Einzelzellsuspension erzeugt, zu der anschließend 800 µl Neurobasal-Medium hinzugegeben wurde. Zum Panning, was der Selektion der in der Zellsuspension enthaltenen Motoneuronen dient, wurden 24-well-Platten (Nunclon™ Surface) verwendet, die zuvor mit einer Lösung von MLR3-Antikörper (Konzentration 1:2000) in TRIS-Puffer versetzt (400 µl pro well) und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden waren. Der MLR3-Antikörper richtet sich gegen den p75-Neurotrophinrezeptor, der auf Motoneuronen exprimiert wird. Zur Entfernung von nichtgebundenen Antikörpern wurden die Platten dreimal mit Neurobasal-Medium (500 µl pro well) gewaschen. Auf die gewaschenen Panning-

Platten wurde nun die Zellsuspension aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur erschütterungsfrei inkubiert. Danach wurde die Platte wiederum drei Mal mit im Wasserbad auf 37°C erwärmtem Neurobasal gewaschen, um die nichtgebundenen Anteile der Zellsuspension zu entfernen. Die Antikörperbindung wurde im Anschluss durch Zugabe von 500 µl ebenfalls auf 37°C erwärmter Depolarisationslösung gelöst. Nach Zugabe von 37°C warmem Motoneuron-Medium wurde die Zellsuspension in 15 ml-Falcons überführt und für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert, um die Zellen am Boden des Falconröhrchens zu konzentrieren. Der entstandene Überstand wurde bis auf etwa 200 µl abgenommen. In dem verbliebenen zellreichen Medium wurde die Zellzahl pro ml mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf vorbereitete Schälchen ausplattiert.

Zur Vorbereitung der Zellkulturschälchen wurden kreisrunde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 22 mm (H. Saur Laborbedarf) am Vortag der Zellkulturanlage in Petrischalen (Durchmesser 35 mm, Sarstedt) eingelegt und mit 200 µl 1xPORN beschichtet. Nach Lagerung über Nacht im Kühlschrank wurden die Deckgläschen dreimal mit HBSS gewaschen, um das 1xPORN zu entfernen. Anschließend wurden 200 µl Merosin-Verdünnung in PBS für mindestens eine Stunde auf die beschichteten Deckgläschen aufgetragen. Vor Ausplattierung der Zellen wurde das nicht gebundene Merosin abgesaugt.

Als Nährmedium wurde pro Schälchen 1,5 ml Motoneuron-Medium verwendet, welches mit den neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF in einer Konzentration von 10 ng/ml versetzt wurde. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Zellen Roscovitine bzw. Valproat in unterschiedlichen Konzentrationen ins Medium gegeben. Die Zellkultur wurde für fünf bis sieben Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag vollständig ausgewechselt, wobei besonders darauf geachtet werden musste, dass die Zellen nicht austrocknen.

Diese Methode zur Präparation des Rückenmarks mit anschließender Anlage der Motoneuronzellkultur wurde von Wiese und Kollegen beschrieben (Wiese et al., 2010).

### **2.2.3 Immunzytochemie der Motoneurone**

Die Motoneurone wurden für fünf bzw. sieben Tage kultiviert. Die Fixierung erfolgte durch Absaugen des Nährmediums und Ersatz durch 4% PFA in PBS. Hiermit wurden die Zellen für 30 Minuten behandelt, anschließend wurden sie in 1xPBS überführt, worin sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden konnten.

Für die immunzytochemische Färbung wurden die Plättchen zur Rehydrierung zunächst drei Mal mit 1,5 ml 1xTBS-T gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen fünf Minuten mit -20°C kaltem 100%-igem Aceton behandelt. Nach der Überführung der Glasplättchen in neue Schälchen (die Kunststoffoberfläche wird durch Aceton angegriffen) wurden sie erneut dreimal mit 1xTBS-T gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 10% BSA (in 1xTBS-T) blockiert.

Die Primärantikörperverdünnung wurde in 1% BSA (in 1xTBS-T) angesetzt und nach Absaugen der Blockierlösung auf die Glasplättchen gegeben. So wurden die Zellen über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde die überschüssige Primärantikörperlösung drei Mal mit 1xTBS-T abgewaschen. Die unspezifischen Bindungen wurden wiederum durch 30-minütige Behandlung mit 10% BSA (in 1xTBS-T) geblockt. Die fluoreszierenden Sekundärantikörper wurde in 1% BSA (in 1xTBS-T) gelöst und für 30 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur auf die Plättchen aufgetragen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xTBS-T wurden die Plättchen in Mowiol eingebettet und für zwei Tage getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtabschluss.

Die Mikroskopie der Präparate erfolgte mit konfokalen Mikroskopen der Firma Leica (TCS 4D und TCS SP2), wobei darauf geachtet wurde, dass jeweils identische Einstellungen für Voltage (Laserstärke) und Pinhole (Blende) bei zusammengehörenden Experimenten verwendet wurden, um miteinander vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

#### **2.2.4 Bestimmung der Zellüberlebensraten**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte am Tag nach der Kulturanlage (Tag 1) sowie am vierten und am sechsten Tag. Hierzu wurde ein Mikroskop mit eingearbeitetem Gitterfeld (Größe 1,16 mm<sup>2</sup>) verwendet. Pro Deckgläschen wurden zwanzig dieser Felder ausgezählt.

Die einzelnen ermittelten Werte (überlebende Motoneurone pro Deckgläschen in Prozent der ursprünglich gezählten) wurden zusammengefasst. Hierbei wurde unterschieden zwischen Kulturen, die nur mit neurotrophen Faktoren und solchen, die zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine behandelt worden waren.

#### **2.2.5 DNA-Isolation**

Als Material zur Genotypisierung der Embryonen wurden die in 200 µl Lysispuffer eingelegten Kopfstücke verwendet. In jedes Eppendorf-Röhrchen wurden 10 µl Proteinase K gegeben, um die Proteinstrukturen anzudauen und die DNA freizulegen. Der Ansatz wurde bei 55°C bei 750 Umdrehungen pro Minute für 2 Stunden in den Schüttler gestellt und danach 8 Minuten lang bei 100°C aufgeköcht. Das Produkt wurde 5 Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Aus dem DNA-haltigen Überstand wurden 100 µl zur weiteren Verwendung abgenommen. Mittels eines Photometers wurde die DNA-Konzentration in jeder Probe bestimmt und mit HPLC-Wasser auf eine Endkonzentration von 100-150 ng/µl verdünnt. Die so behandelte DNA konnte für die PCR verwendet werden.

#### **2.2.6 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient zur Amplifizierung und Visualisierung bestimmter DNA-Abschnitte, deren Sequenz bekannt ist. Ein Zyklus der Reaktion läuft nach folgendem Schema ab: Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 90°C in seine Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend kühlt man den Ansatz auf 50°C ab, damit sich die Primer (zum 5'-Ende des jeweiligen Einzelstrangs komplementäre Oligonukleotidsequenzen) anlagern können. Hierauf synthetisiert die Taq-Polymerase, eine aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene hitzebeständige DNA-Polymerase, die Komplementärstränge

an die aufgetrennten Einzelstränge, während die Reaktion auf 60°C bis 70°C erwärmt wird. Die Verwendung dieses Enzyms ist notwendig, da sich bei Temperaturen, bei denen DNA-Polymerasen von Säugetieren arbeiten könnten, die DNA-Einzelstränge wieder zusammenlagern würden. Außerdem können in der Wärme unspezifische Primerbindungen und damit Fehlhybridisierungen besser verhindert werden. Dieser Reaktionszyklus kann nun beliebig oft wiederholt werden, was zu einer exponentiellen Zunahme des amplifizierten DNA-Abschnitts führt.

Es wurden pro Embryo zwei PCRs durchgeführt:

wt-PCR: Zum Nachweis des wildtypischen *Smn*-Gens verwendete man die Primer GMS 11 (Intron 1, fw.) und MSMN 11 (Exon 2, rev.) in einer Konzentration von je 100 pmol/µl.

ko-PCR: Um bei fehlender Bande in der wt-PCR sicher sein zu können, dass es sich um einen *Smn*-Knockout und nicht um einen Fehler handelt, wurde zusätzlich die LacZ-Kassette bestimmt, die zum Knockout des *Smn*-Gens in die murine DNA eingesetzt ist. Hierzu wurden die Primer GMS 11 (Intron 1, fw.) in einer Konzentration von 100 pmol/µl und GNA 3ab (LacZ- Kasette, rev.) in einer Konzentration von 10 pmol/µl genutzt.

Die Sequenzen der Primer sind im Abschnitt 2.1.3 auf Seite 28 zu finden.

Der PCR-Ansatz von je 50 µl enthielt folgende Komponenten:

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| 1,5 µl   | DNA                   |
| 1 µl     | dNTPs (10 mM)         |
| 0,15 µl  | Primer 1              |
| 0,15 µl  | Primer 2              |
| 5 µl     | 10xPuffer             |
| 10 µl    | Betain (5 M)          |
| 0.5 µl   | Taq-Polymerase        |
| Ad 50 µl | HPLC-H <sub>2</sub> O |

Alle Bestandteile sowie der fertige Ansatz wurden ständig auf Eis gekühlt. Betain wurde nur bei der wt-PCR in den Ansatz gegeben. Der gesamte Ansatz wurde kurz im Vortex geschüttelt.



Für die PCR wurden die folgenden Bedingungen gewählt:

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| 1 Zyklus:  | 3 min. bei 94°C                      |
| 38 Zyklen: | 30 sec. bei 94°C                     |
|            | 45 sec. bei 56°C                     |
|            | 1,5 min. bei 72°C                    |
| 1 Zyklus:  | 5 min. bei 72°C                      |
| danach:    | Kühlung bei 15°C in der PCR-Maschine |

Die Lagerung der Ansätze nach erfolgter PCR erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank. Das PCR-Produkt der wt-PCR hat eine Größe von etwa 800 bp, das der ko-PCR von etwa 600 bp.

### **2.2.7 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Ladung und Größe. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose pro 100 ml 1xTAE durch Erhitzen gelöst, nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid ließ man den Ansatz in der vorbereiteten Form erkalten. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1xTAE gefüllt und das Gel hineingegeben.

Die amplifizierten PCR-Ansätze wurden mit je 10 µl 6xLadepuffer vermischt. Von den so entstandenen Ansätzen wurden je 30 µl in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Als DNA-Marker wurden 10 µl des 100 bp plus-Markers verwendet. Die Elektrophorese lief bei 200 V Spannung und 140 mA Stromstärke für 1,25 Stunden. Das im Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert die DNA und macht so die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar.

### **2.2.8 Datenanalyse**

Für die Quantifizierung der Axone der Motoneurone wurden nur solche Zellen ausgewählt, deren Neuriten eine eindeutige Differenzierung zwischen Axonen und Dendriten zuließen. Als Axone wurden die Neuriten identifiziert, die mindestens zweimal länger als Dendriten waren. Es wurde nur der längste axonale Ausläufer vermessen. Zur Bestimmung der Größe von Wachstumskegeln wurden nur β-Aktin-positive Wachstumskegel untersucht.

Zur Quantifizierung der Proteinmengen von  $\beta$ -Aktin, N-Typ-Kalziumkanälen und Smn-Protein erfolgte die Messung der Signalintensität der Färbung im Zellkörper, Axon und Wachstumskegel als Intensität (quantum levels) der einzelnen Pixel (arbitrary unit). Dabei wurde die Hintergrundintensität für jedes einzelne Motoneuron bestimmt und von der ermittelten Signalintensität des untersuchten Objekts abgezogen.

Die für die Analyse erforderlichen Bilder der immunzytochemisch gefärbten Zellkulturen wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Für die Quantifizierung der Axonlängen und der Wachstumskegelgrößen wurde Scion Image software package (Scion Corporation, National Institute of Health), für die Messungen der Signalintensitäten AIDA Software (Raytest, Deutschland) verwendet.

Zur Erstellung aller Diagramme wurden Messwerte voneinander unabhängiger Experimente verwendet, die durch Auswertung von Motoneuronkulturen beider untersuchter Genotypen (*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2* und *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*) aus mindestens drei Embryonen und unterschiedlichen Würfen gewonnen wurden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angeben. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test unter Benutzung der GraphPad Prism 4 und 6 Software angewendet.

### **3. Ergebnisse**

#### ***3.1 Einfluss unterschiedlicher R-Roscovitine-Konzentrationen auf das Überleben kultivierter Motoneurone.***

Um gezielte Experimente mit dem Kalziumkanal-Agonisten R-Roscovitine durchzuführen zu können war es zunächst nötig, dessen Einfluss auf das Überleben kultivierter Motoneurone zu untersuchen. Es wurde mit Konzentrationen ab 10 µM R-Roscovitine im Medium begonnen. Die aus dem lumbalen Rückenmark 14 Tage alter Mausembryonen stammenden Motoneurone wurden sechs Tage lang auf Laminin-221 in Gegenwart der neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF kultiviert. Am ersten, vierten und sechsten Tag wurde eine Zellzahl-Bestimmung überlebender Motoneurone durchgeführt und hieraus eine Statistik erstellt. Da bekannt ist, dass es in diesem Zeitraum keinen Unterschied im Überleben zwischen *Smn*-defizienten und den für die weiteren Experimente als Kontrollzellen verwendeten *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneuronen gibt (Rossoll et al. 2003), wurde auf eine Unterscheidung hinsichtlich des Genotyps verzichtet. R-Roscovitine wurde in Konzentrationen von 10 µM, 20 µM und 50 µM dem Medium zugegeben; zusätzlich wurden zur Kontrolle auch Kulturen ohne Zusatz von R-Roscovitine ausgezählt. Beide Kulturen wurden in gleicher Weise mit neurotrophen Faktoren behandelt. Es fand sich ein rasches, deutliches Absinken der Überlebensraten der mit R-Roscovitine behandelten Motoneurone im Vergleich zu den ausschließlich mit neurotrophen Faktoren behandelten Kulturen, das bis zum weitestgehenden Absterben aller mit R-Roscovitine behandelten Motoneurone am Tag 6 ging.

|                   | Tag 1 [%] | Tag 4 [%]  | Tag 6 [%]  |
|-------------------|-----------|------------|------------|
| ohne Roscovitine  | 100       | 69,2 ± 1,2 | 59,4 ± 2,3 |
| 10 µM Roscovitine | 100       | 57,4 ± 7,5 | 1,3 ± 1,3  |
| 20 µM Roscovitine | 100       | 25,9 ± 2,4 | 0          |
| 50 µM Roscovitine | 100       | 4,1 ± 0,5  | 0          |

**Tabelle 3a:** Überlebensraten kultivierter Motoneurone unter Behandlung mit R-Roscovitine in Konzentrationen von 10 µM, 20 µM und 50 µM im Medium sowie einer Kontrollkultur (Angabe in Prozent). Die mit R-Roscovitine behandelten Motoneurone starben bis zum sechsten Tag der Kultur weitestgehend ab.

Daraufhin wurden die Konzentrationen von R-Roscovitine im Medium gesenkt. Es wurden in gleicher Weise die überlebenden Zellen in Kulturen mit Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine sowie wiederum eine nur mit neurotrophen Faktoren behandelte Kultur gezählt. Hierbei erwies sich das Überleben der mit diesen niedrigen Konzentrationen von R-Roscovitine behandelten Motoneuronen gegenüber der Kontrollkultur als unbeeinträchtigt.

|                          | Tag 1 [%] | Tag 4 [%]      | Tag 6 [%]      |
|--------------------------|-----------|----------------|----------------|
| ohne Roscovitine         | 100       | 69,2 $\pm$ 1,2 | 59,4 $\pm$ 2,3 |
| 0,01 $\mu$ M Roscovitine | 100       | 68,5 $\pm$ 3,8 | 61,1 $\pm$ 2,3 |
| 0,05 $\mu$ M Roscovitine | 100       | 56,3 $\pm$ 3,2 | 58,2 $\pm$ 2,6 |
| 0,1 $\mu$ M Roscovitine  | 100       | 60,6 $\pm$ 3,3 | 62,0 $\pm$ 1,7 |
| 0,5 $\mu$ M Roscovitine  | 100       | 67,5 $\pm$ 2,0 | 62,1 $\pm$ 1,6 |

**Tabelle 3b:** Überlebensraten isolierter embryonaler Motoneurone unter Behandlung mit R-Roscovitine in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M 0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M im Medium sowie einer Kontrollkultur (Angabe in Prozent). Das Überleben der Motoneurone wurde durch die Behandlung mit R-Roscovitine in diesen Konzentrationen nicht beeinträchtigt, es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede der behandelten Motoneurone zu den Kontrollkulturen.

### **3.2 R-Roscovitine beeinflusst weder die Menge noch die Verteilung des Snn-Proteins.**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Überleben kultivierter embryonaler Motoneurone durch die Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von R-Roscovitine nicht beeinflusst wird, wurde überprüft, ob die Anwesenheit von R-Roscovitine die Menge oder die Verteilung des Snn-Proteins in den Motoneuronen verändert. Das war äußerst wichtig, da Snn-unabhängige Effekte der Substanz untersucht werden sollten. Der postulierte Effekt von R-Roscovitine wird nicht über das Snn-Protein selbst, sondern vielmehr über die Wirkung von R-Roscovitine an den spannungsabhängigen Kalziumkanälen im Wachstumskegel der Motoneurone vermittelt. Nichts desto trotz erschien eine Beeinflussung von Menge und Verteilung des Snn-Proteins grundsätzlich möglich und musste überprüft werden.

Um das Verteilungsmuster des Snn-Proteins zu untersuchen, wurden immunzytochemische Methoden angewendet. *Snn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Snn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneurone wurden nach fünftägiger Zellkultur mit Antikörpern gegen das Snn-Protein gefärbt, wobei für beide Genotypen Kulturen mit und ohne Zugabe von R-

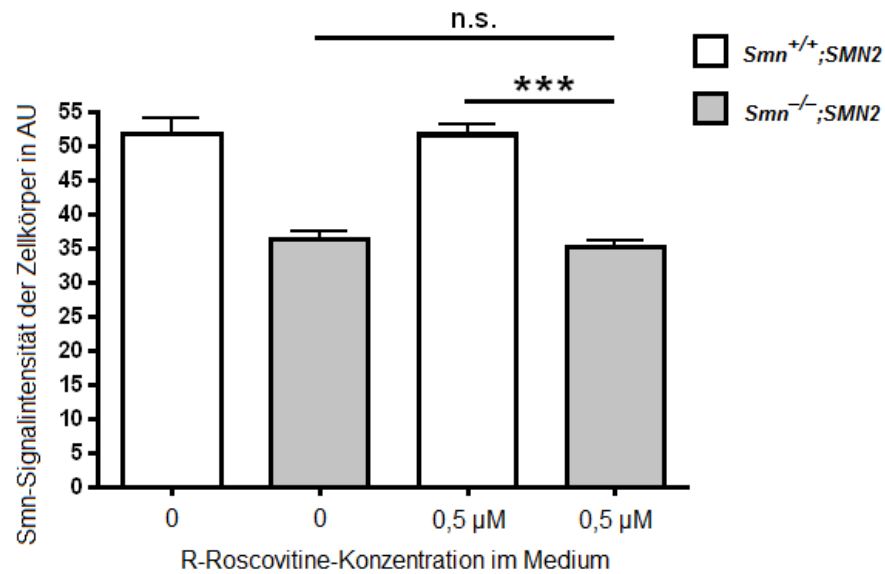
Roscovitine analysiert wurden. Als Konzentration wurde 0,5  $\mu\text{M}$  R-Roscovitine gewählt, was sich in den vorangegangenen Experimenten als höchste von den Motoneuronen tolerierte Konzentration erwiesen hatte, weswegen ein möglicher Effekt hier am deutlichsten erwartet werden konnte. Das Augenmerk wurde hierbei sowohl auf den Wachstumskegel, als auch auf das Axon und das Perikaryon, den Zellkörper der Motoneurone gelegt. Bei den entstandenen Bildern wurde mit der AIDA-Software von Biorad die Signalintensität (quantum levels) der einzelnen Pixel gemessen, angegeben in arbitrary units (AU).

Weder im Zellkörper, noch in den Axonen oder den Wachstumskegeln der Kontrollzellen war ein Unterschied in der Verteilung des Smn-Proteins zwischen den Kontrollkulturen und den mit 0,5  $\mu\text{M}$  R-Roscovitine behandelten Zellen nachweisbar. Die unbehandelten Smn-defizienten Motoneurone zeigten in allen drei untersuchten Zellkompartimenten signifikant geringere Smn-Signalintensitäten, wie es nicht anders zu erwarten war. Aber auch bei den mit 0,5  $\mu\text{M}$  R-Roscovitine behandelten *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneuronen ließ sich kein Anstieg der Smn-Proteinmenge nachweisen. Es fand sich in keinem der untersuchten Kompartimente ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Die Präparate wurden zusätzlich mit dem sich an DNA anlagernden Farbstoff DAPI gefärbt, um Zellkerne und damit intakte Zellen sicher identifizieren zu können. Die Ergebnisse sind im Weiteren tabellarisch und graphisch dargestellt (Tabelle 4, Abbildung 5); Abbildung 6 zeigt beispielhaft Zellkörper, Axone und Wachstumskegel von Kontrollzellen und Smn-defizienten Motoneuronen.

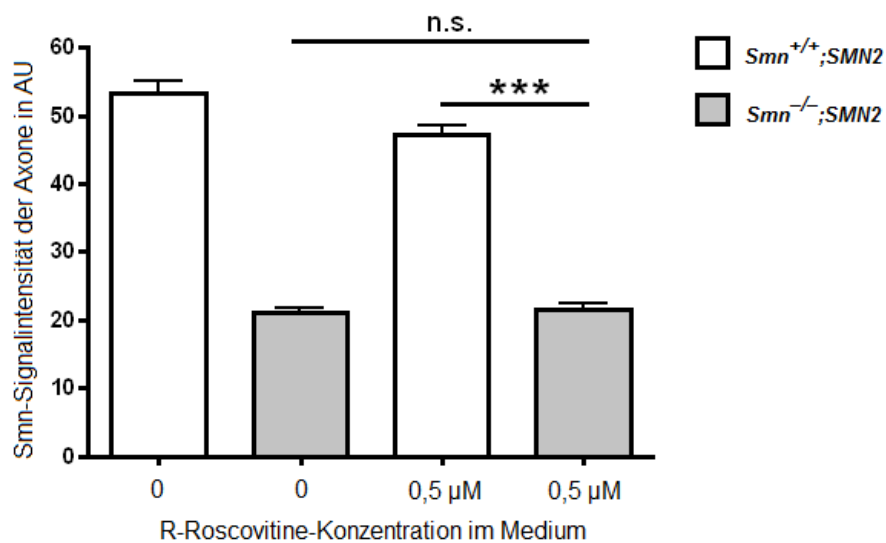
#### A: Smn-Verteilung in Zellkörpern

|                                 | ohne R-Roscovitine [AU] | mit 0,5 $\mu\text{M}$ R-Roscovitine [AU] |
|---------------------------------|-------------------------|--|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ;SMN2 | 51.9 $\pm$ 2.3 AU       | 51.6 $\pm$ 1.5 AU                        |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ;SMN2 | 36.3 $\pm$ 1.3 AU       | 35.2 $\pm$ 0.8 AU                        |



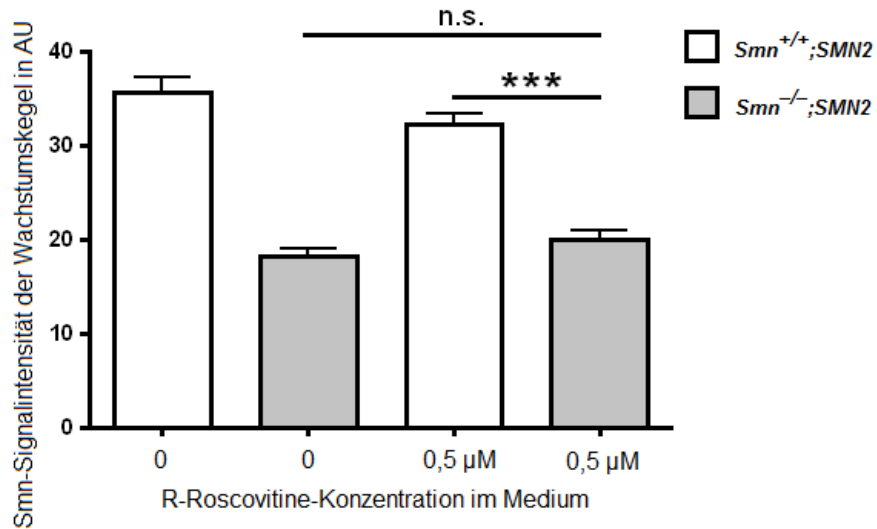
### B: Smn-Verteilung in Axonen

|                                 | ohne R-Roscovitin [AU] | mit 0,5 μM R-Roscovitin [AU] |
|---------------------------------|------------------------|------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ;SMN2 | 53.4 ± 1.8 AU          | 47.1 ± 1.5 AU                |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ;SMN2 | 21.0 ± 0.8 AU          | 21.6 ± 0.8 AU                |

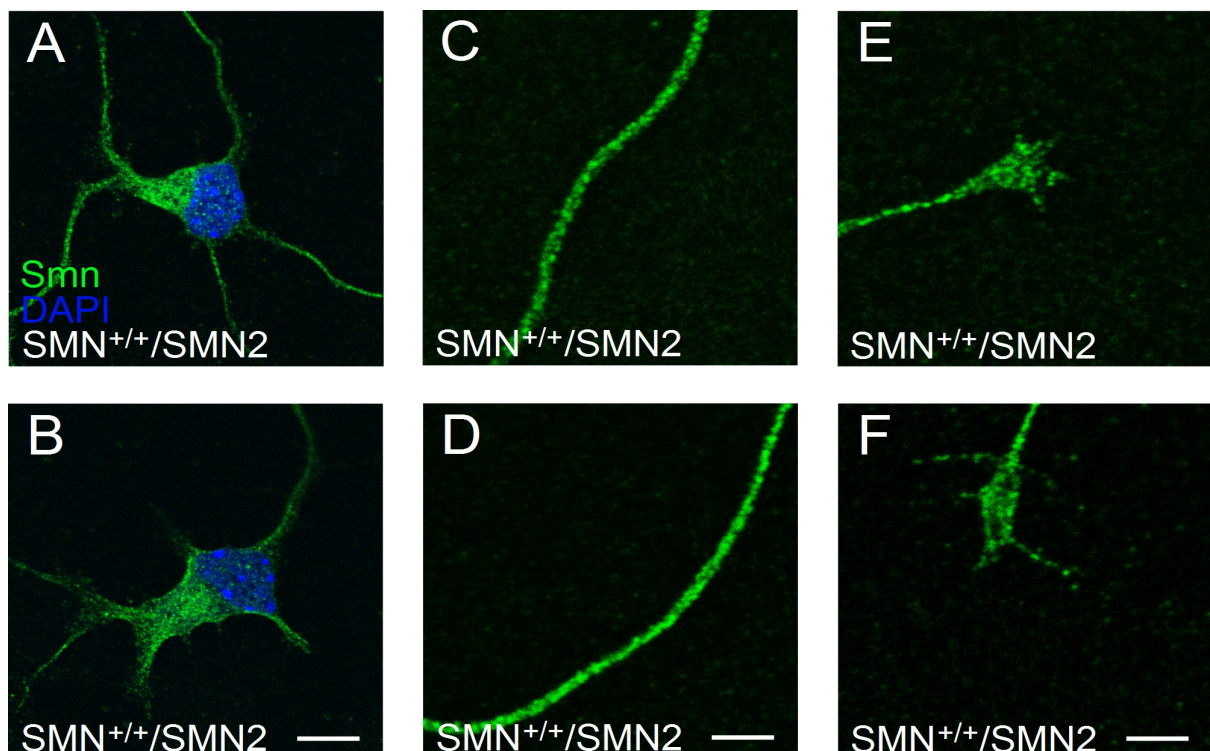


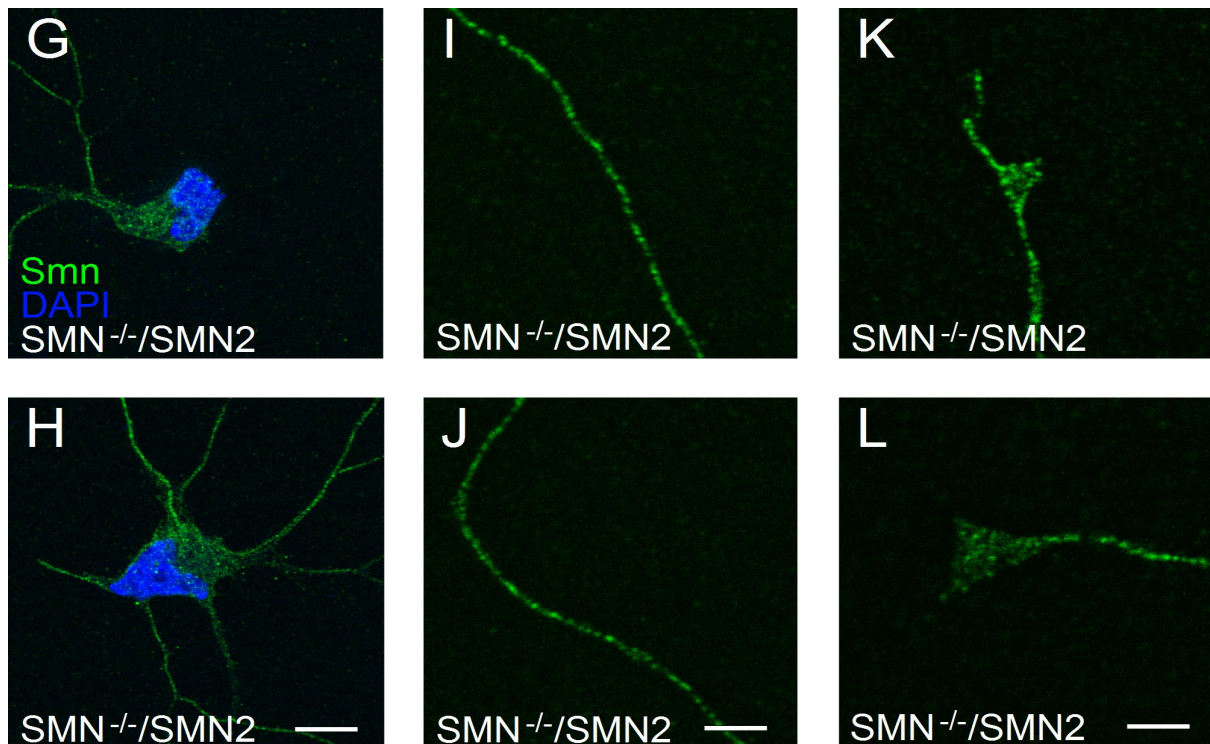
### C: Smn-Verteilung in Wachstumskegeln

|                                 | ohne R-Roscovitin [AU] | mit 0,5 μM R-Roscovitin [AU] |
|---------------------------------|------------------------|------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ;SMN2 | 35.6 ± 1.7 AU          | 32.3 ± 1.1 AU                |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ;SMN2 | 18.1 ± 0.9 AU          | 20.1 ± 0.9 AU                |



**Tabelle 4 a-c und Abbildung 5 a-c:** Tabellarische und graphische Darstellungen der Smn-Signalintensität isolierter *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneurone in Zellkörpern, Axonen und Wachstumskegeln mit Angabe der Standardabweichung. Zellen beider Genotypen wurden mit und ohne Behandlung mit 0,5 μM R-Roscovitine untersucht. In keinem der untersuchten Zellkompartimente konnte durch die R-Roscovitine-Behandlung eine Veränderung der Smn-Intensität beobachtet werden. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0.05$ , statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 60 Einzelmessungen gewonnen.





**Abbildung 6 a+b:** Abbildungen der Zellkörper, Axone und Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörperfärbungen gegen Smn-Protein (grün). Es sind jeweils typische Beispiele für *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneurone (A-F) und für *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneurone (G-L) abgebildet. Die Behandlung mit R-Roscovitine zeigt keinen Einfluss auf die bei den Smn-defizienten Zellen erniedrigte Smn-Proteinmenge. Die Länge der Maßstabbalken beträgt bei den Zellkörpern 20  $\mu\text{m}$ , bei den Axonen und Wachstumskegeln je 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 R-Roscovitine erhöht die Akkumulation von N-Typ Kalziumkanälen im Wachstumskegel Smn-defizienter Motoneurone.**

Zur Ausbildung einer funktionierenden Synapse ist eine Differenzierung der unreifen Wachstumskegel zu Präsynapsen essentiell. Nur hierdurch wird die spätere Funktion der Synapse in Form einer spezifischen Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt nach Kalziumeinstrom möglich. Während in der Embryonalentwicklung vor allem N-Typ-Kalziumkanäle (Typ  $\text{Ca}_v2.2$ ) hierfür verantwortlich sind, werden diese in den ersten Lebenswochen durch Kanäle vom P/Q-Typ ( $\text{Ca}_v2.1$ ) ersetzt.

Während der neuronalen Entwicklung können spontane Kalziumeinströme zum Differenzierungsverhalten im Speziellen des axonalen Längenwachstums beitragen. Diese spontanen Kalziumeinströme entstehen unter anderem durch eine Wechselwirkung der  $\beta 2$ -Untereinheit des Matrixproteins Laminin-221, welches im



Bereich der späteren postsynaptischen Membran des Muskels vorkommt, mit der pore-forming Untereinheit des  $Ca_v2.2$ -Kalziumkanals. Durch Assoziation der beiden Interaktionspartner entsteht eine vermehrte Cluster-Formation des Kanals und der Kanal öffnet sich, was durch einen erhöhten Kalziumeinstrom messbar ist (Nishimune et al., 2004, Jablonka et al., 2007). Eine erhöhte Frequenz dieser spontanen Kalziumeinströme wirkt als ein „Stop-“ beziehungsweise Differenzierungs-Signal, welches sich in der Zellkultur auf Laminin-221 durch ein verkürztes Längenwachstum äußert (Jablonka et al., 2007). Die Axone *Smn*-defizienter primärer Motoneurone weisen im distalen Bereich und ganz besonders im Wachstumskegelbereich eine verminderte  $Ca_v2.2$ -Cluster-Formation auf, was durch eine Intensitätsmessung nach einer  $Ca_v2.2$ -Antikörperfärbung herausgefunden werden konnte (Jablonka et al., 2007). Diese verminderte  $Ca_v2.2$ -Cluster-Formation hat dann durch Ausbleiben des kalziumvermittelten Differenzierungssignals indirekt eine erhöhte Axonlänge der auf Laminin-221 kultivierten Motoneurone zur Folge (Jablonka et al., 2007). Nachdem nun nachgewiesen wurde, dass weder Menge noch Verteilung des *Smn*-Proteins in kultivierten Motoneuronen durch R-Roscovotine beeinflusst werden, war es interessant, zu untersuchen, in wie weit diese verminderte  $Ca_v2.2$ -Cluster-Formation durch den Einsatz von R-Roscovotine modulierbar ist.

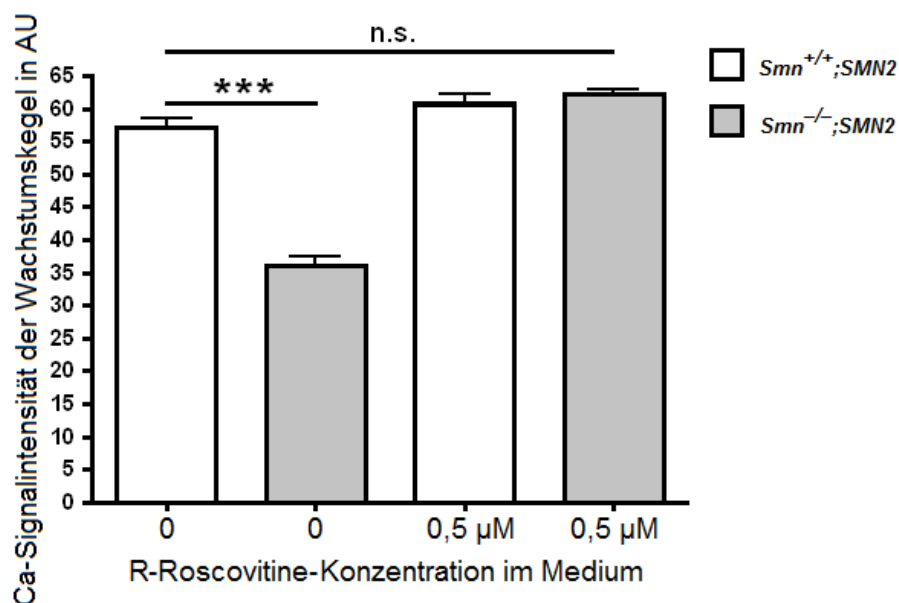
*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneurone wurden nach fünftägiger Zellkultur mit Antikörpern gegen die  $\alpha 2$ -Kette der  $Ca_v2.2$ -Untereinheit gefärbt. Es wurden wiederum Kulturen mit und ohne Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovotine analysiert. Erneut wurde die Signalintensität (quantum levels) der einzelnen Pixel gemessen (arbitrary units [AU]). Die Signalintensität spiegelt die Effektivität der Kalziumkanal-Akkumulation wieder, da wie oben beschrieben die Cluster-Formation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle im Axonterminus bei *Smn*-defizienten Motoneuronen gestört ist.

*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneurone wiesen ohne Behandlung eine  $Ca_v2.2$ -Signalintensität von  $57.2 \pm 1.5$  AU auf. Unter Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovotine stieg diese leicht auf  $60.9 \pm 1.4$  AU an, dieser Unterschied erwies sich als nicht statistisch signifikant. Die Intensität des  $Ca_v2.2$ -Signals der Wachstumskegel von *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen stieg im Vergleich dazu durch R-Roscovotine-Behandlung stark an. Unbehandelt lag die Intensität bei  $36.2 \pm 1.3$  AU, mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovotine hingegen

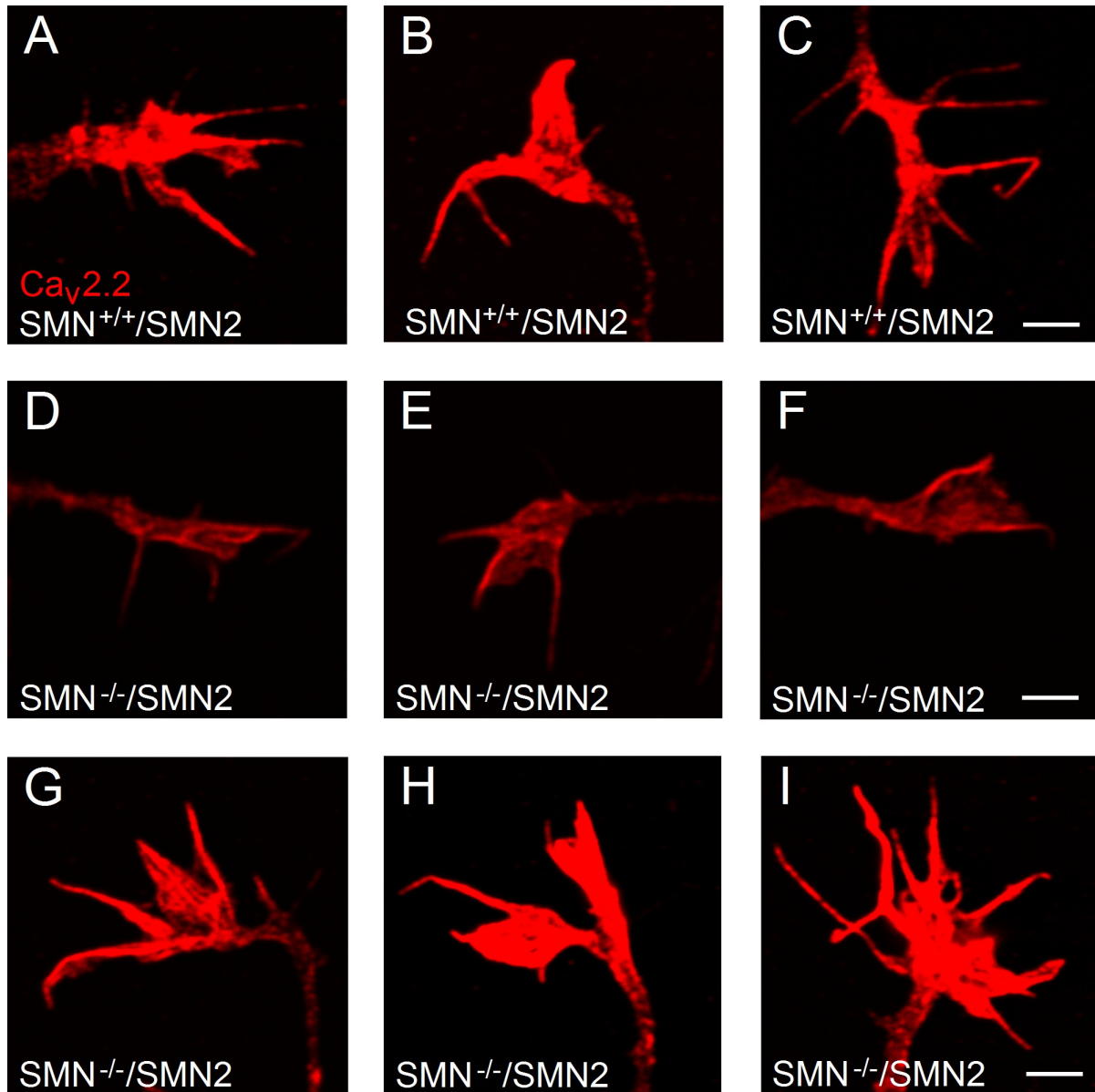
bei  $62.2 \pm 0.9$  AU. Somit war eine hochsignifikante Zunahme der Intensität zu verzeichnen, was Rückschlüsse auf eine verbesserte Akkumulation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle zulässt. Es lag kein statistisch signifikanter Signalunterschied zu den Kontrollzellen mehr vor, der krankheitsspezifische Phänotyp bei  $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen erschien kompensiert.

Die Ergebnisse der Messungen sind tabellarisch, graphisch und anhand ausgewählter Abbildungen in der Tabelle 5 und den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

|                  | ohne R-Roscovitine [AU] | mit 0,5 $\mu$ M R-Roscovitine [AU] |
|------------------|-------------------------|------------------------------------|
| $Smn^{+/+};SMN2$ | $57.2 \pm 1.5$ AU       | $60.9 \pm 1.4$ AU                  |
| $Smn^{-/-};SMN2$ | $36.2 \pm 1.3$ AU       | $62.2 \pm 0.9$ AU                  |



**Tabelle 5 und Abbildung 7:** Tabellarische und graphische Darstellung der  $Ca_v2.2$ -Signalintensität der Wachstumskegel von  $Smn^{+/+};SMN2$ - und  $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen mit und ohne Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine unter Angabe der Standardabweichung. Das  $Ca_v2.2$ -Signal der mit R-Roscovitine behandelten  $Smn$ -defizienten Motoneurone glich sich an das der Kontrollzellen an. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0.05$ . Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 60 Einzelmessungen gewonnen.



**Abbildung 8:** Abbildungen von Immunfluoreszenzfärbungen der Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörperfärbungen gegen  $Ca_v2.2$ -Kalziumkanäle (rot). Es werden typische Beispiele für  $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneurone (A-C) und für unbehandelte (D-F) sowie mit  $0,5 \mu\text{M}$  R-Roscovitine behandelte  $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone (G-I) gezeigt. Die  $Ca_v2.2$ -Signalintensität der unbehandelten  $Smn$ -defizienten Neurone ist gegenüber Kontrollzellen signifikant herabgesetzt; dieser Defekt wird durch die Behandlung mit  $0,5 \mu\text{M}$  R-Roscovitine aufgehoben. Die Länge der Maßstabbalken beträgt  $10 \mu\text{m}$ .

### **3.4 Valproat beeinflusst weder die Menge noch die Verteilung von Smn-Protein und N-Typ Kalziumkanälen.**

Seit 2003 wurden Ergebnisse publiziert, die zunächst in Fibroblasten von SMA-Patienten, später aber auch in neuronalen Zellen sowohl eine Steigerung der Expression des SMN-Proteins als auch eine erhöhte Transkriptionsrate der *SMN2*-mRNA durch Behandlung mit Valproat (VPA) beschrieben (Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003; Bergeijk et al., 2006; Hahnen et al., 2006). Zurückgeführt wurde diese Beobachtung auf die HDAC-Inhibition durch VPA. Bei neuronalen Stammzellen (NSCs) des Genotyps *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2* wurde beim Einsatz von VPA in einer Konzentration von 100 µM eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen erhöhte Menge an Smn-Protein nachgewiesen, wohingegen 100 µM VPA in einer Motoneuronkultur keine Steigerung der Smn-Proteinmenge zur Folge hatte (Rak et al., 2009). Allerdings blieb offen, ob es durch VPA-Behandlung (100 µM) zu einer veränderten Verteilung des Smn-Proteins innerhalb der Motoneurone kommt.

Um die Auswirkungen von VPA auf die Verteilung des Smn-Proteins zu untersuchen und mit den durch Einsatz von R-Roscovitine beobachteten Effekten vergleichen zu können, wurden die selben immunzytochemischen Methoden angewendet. Hierfür wurden *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneurone nach fünftägiger Zellkultur auf dem Matrixprotein Laminin-221 mit Antikörpern gegen Smn-Protein gefärbt. Es wurden Kulturen analysiert, die mit VPA in einer Konzentration von 100 µM behandelt worden waren, da sich bei der Untersuchung neuronaler Stammzellen bereits bei dieser Konzentration ein Anstieg der Smn-Proteinmenge gezeigt hatte; zur Kontrolle wurden auch Kulturen beider Genotypen ohne VPA-Behandlung untersucht. Wiederum wurde mit der AIDA-Software die Signalintensität der einzelnen Pixel in Wachstumskegeln, in Axonen und in Zellkörpern der Motoneurone gemessen.

Weder im Zellkörper, noch in den Axonen oder den Wachstumskegeln der *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*-Motoneurone ließ sich ein Unterschied in der Verteilung des Smn-Proteins zwischen den unbehandelten Kontrollkulturen und den mit 100 µM VPA behandelten Zellen finden.

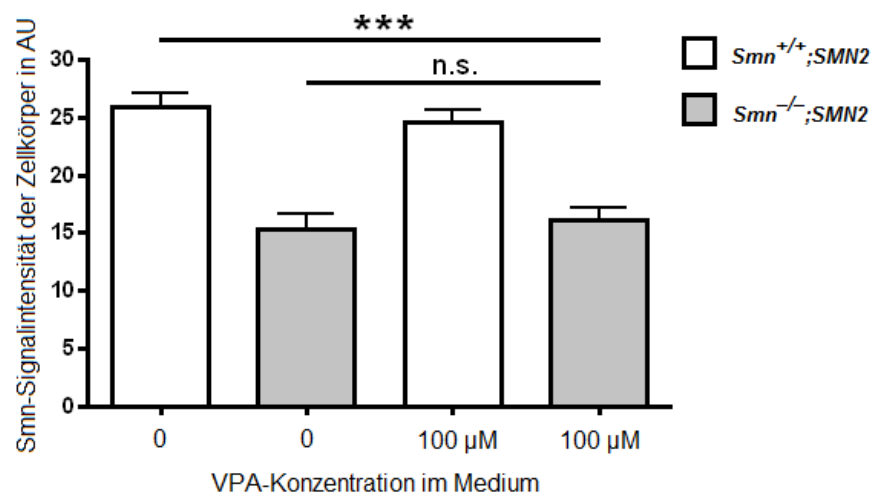
Die unbehandelten Smn-defizienten Motoneurone wiesen erwartungsgemäß in allen drei untersuchten Zellkompartimenten signifikant geringere Smn-Signalintensitäten

als die Kontrollzellen auf. Eben so wenig ließen sich jedoch bei den mit 100 µM VPA behandelten *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneuronen Änderungen in Menge und Verteilung des Smn-Proteins nachweisen. Es fand sich in keinem der Kompartimente ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Tabelle 6 und Abbildung 9 stellen die Messergebnisse dar, Abbildung 10 vergleicht beispielhafte Abbildungen von Zellkörper, Axon und Wachstumskegel von Kontrollzellen und *Smn*-defizienten Motoneuronen.

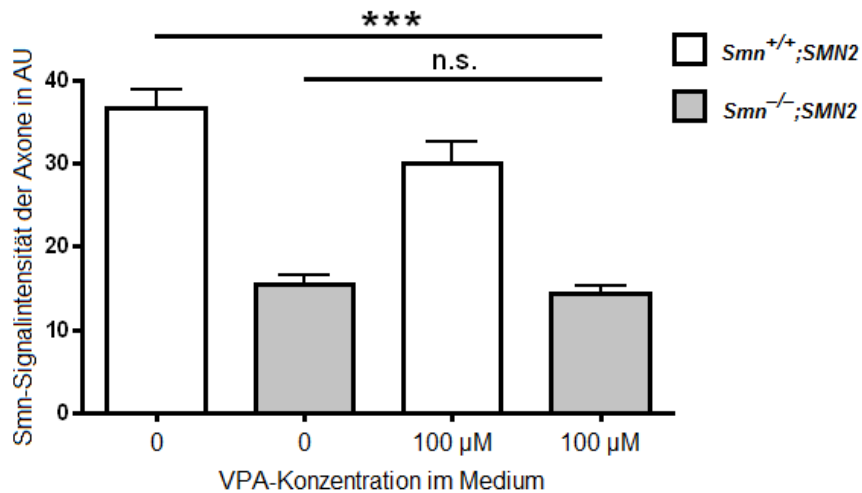
### A: Smn-Verteilung in Zellkörpern

|   | ohne Valproat [AU] | mit 100 µM Valproat [AU] |
|---|--------------------|--------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | 25.9 ± 1.2 AU      | 24.6 ± 1.1 AU            |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | 15.3 ± 1.5 AU      | 16.2 ± 1.0 AU            |



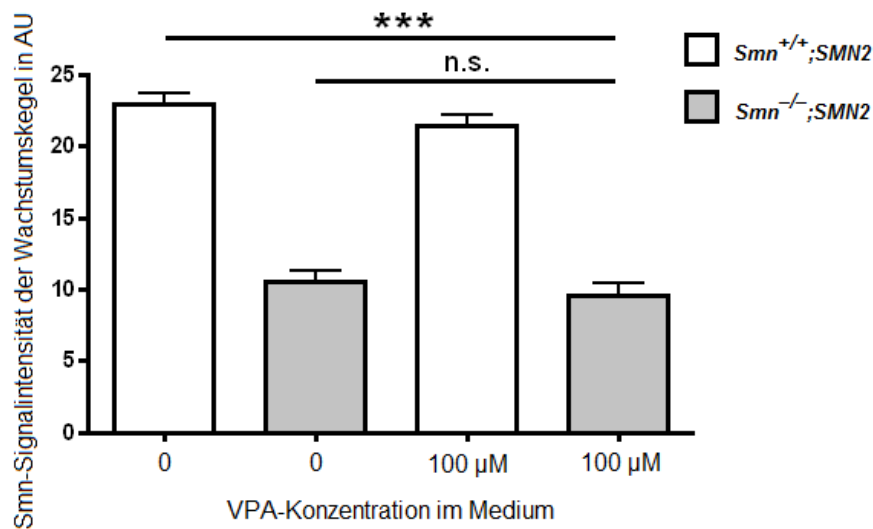
### B: Smn-Verteilung in Axonen

|   | ohne Valproat [AU] | mit 100 µM Valproat [AU] |
|---|--------------------|--------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | 36.8 ± 2.1 AU      | 30.1 ± 2.4 AU            |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | 15.5 ± 1.1 AU      | 14.4 ± 0.8 AU            |

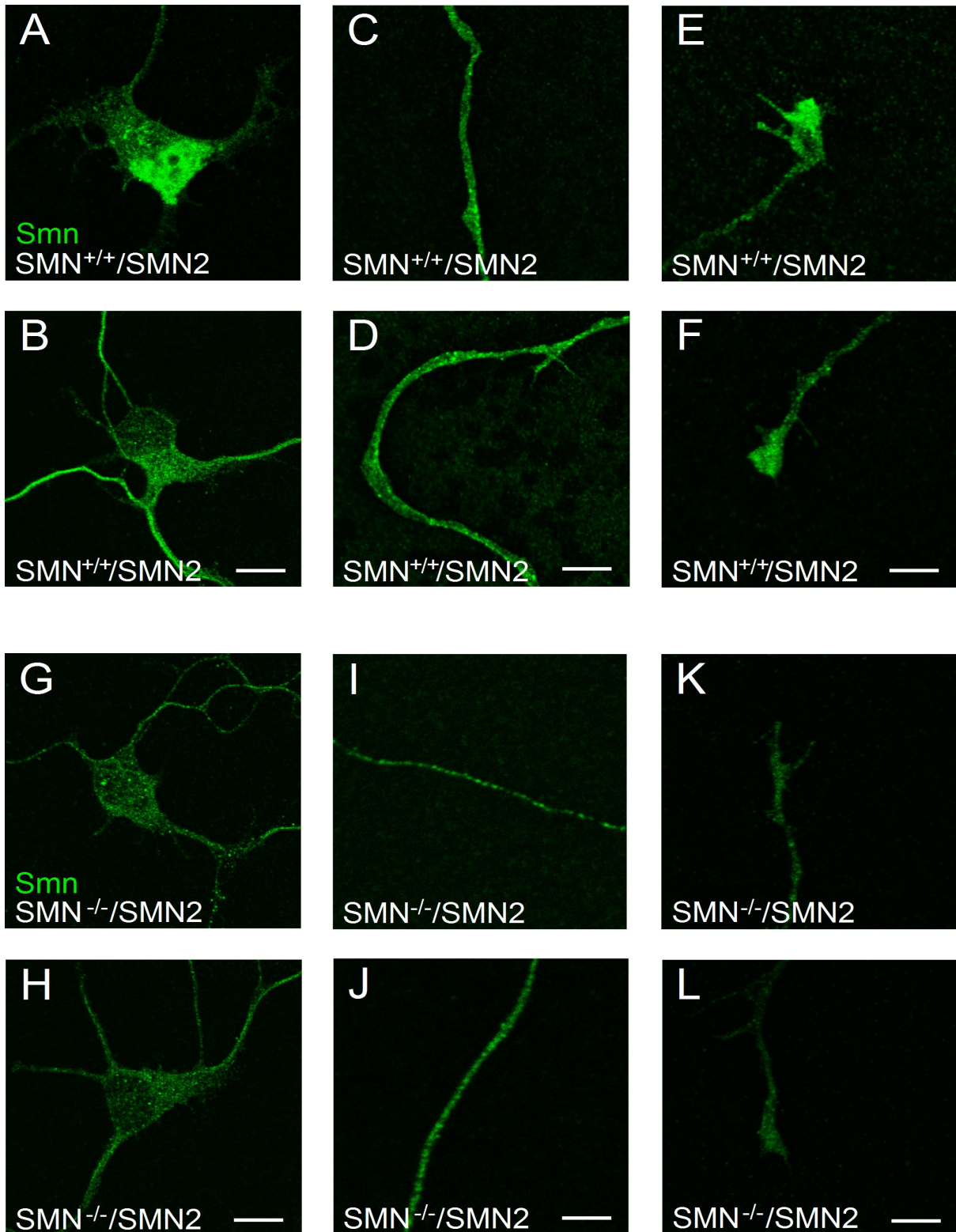


### C: Smn-Verteilung in Wachstumskegeln

|                                 | ohne Valproat [AU] | mit 100 µM Valproat [AU] |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ;SMN2 | 23.0 ± 0.7 AU      | 21.5 ± 0.8 AU            |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ;SMN2 | 10.5 ± 0.8 AU      | 9.6 ± 0.8 AU             |



**Tabelle 6 a-c und Abbildung 9 a-c:** Tabellarische und graphische Darstellungen der Signalintensität von Smn-Protein in Zellkörpern, Axonen und Wachstumskegeln von *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneuronen mit Angabe der Standardabweichung. Zellen beider Genotypen wurden mit und ohne Behandlung mit 100 µM Valproat untersucht. In keinem der untersuchten Zellkompartimente konnte durch die Valproat-Behandlung eine Veränderung der Smn-Intensität verzeichnet werden. Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet.



**Abbildung 10 a+b:** Abbildungen der Zellkörper, Axone und Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörpern gegen Smn-Protein (grün). Es sind jeweils typische Beispiele für  $Smn^{+/+};SMN2$ -Motoneurone (A-F) sowie für  $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneurone (G-L) abgebildet. Die Smn-Proteinverteilung änderte sich in  $Smn^{-/-};SMN2$ -Motoneuronen durch Behandlung mit Valproat nicht. Die Länge der Maßstabbalken beträgt bei den Zellkörpern 15  $\mu m$ , bei den Axonen und Wachstumskegeln je 10  $\mu m$ .

Obwohl sich aus den bis hierhin gewonnenen Daten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der charakteristischen morphologischen Defekte der *Smn*-defizienten Motoneurone durch eine Behandlung mit 100  $\mu$ M VPA ergeben hatten und der anzunehmende Effekt über eine Erhöhung der *Smn*-Proteinmenge hätte vermittelt werden müssen, wurde trotzdem die Wirkung von VPA auf die Verteilung der N-Typ Kalziumkanäle untersucht. Nicht zuletzt hatte sich auch bei den Experimenten mit R-Roscovitine die Normalisierung der Kalziumkanal-Clusterbildung als unabhängig von der Menge und Verteilung des *Smn*-Proteins erwiesen, auch wenn hier von vorne herein ein unterschiedlicher Mechanismus angenommen worden war. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden dieselben immunzytochemischen Methoden angewendet. *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneurone wurden nach fünftägiger Zellkultur mit und ohne Behandlung mit VPA in einer Konzentration von 100  $\mu$ M mit Antikörpern gegen die  $\alpha$ 2-Kette der  $Ca_v2.2$ -Untereinheit angefärbt und die Signalintensität der einzelnen Pixel gemessen und analysiert.

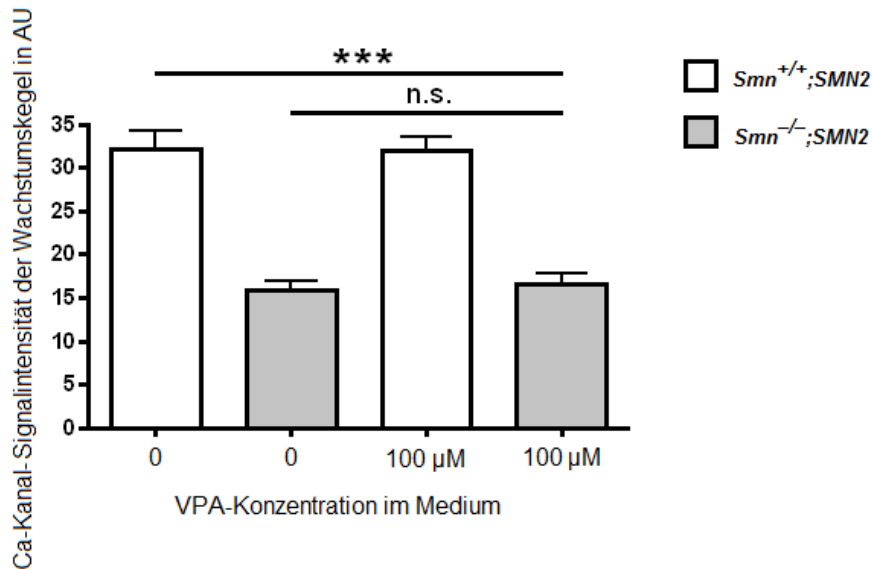
Unbehandelte *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneurone wiesen eine  $Ca_v2.2$ -Signalintensität von  $32.1 \pm 2.1$  AU auf, diese veränderte sich unter Behandlung mit 100  $\mu$ M VPA nur sehr geringfügig auf  $31.9 \pm 1.6$  AU. Wie bei allen vorangegangenen Experimenten erwies sich dieser Unterschied nicht als statistisch signifikant.

Ebenfalls unbeeinflusst durch die Behandlung mit VPA stellte sich die  $Ca_v2.2$ -Intensität der Wachstumskegel und somit die  $Ca_v2.2$ -Akkumulation in Wachstumskegeln *Smn*-defizienter Motoneuronen dar. Ohne VPA fand sich eine Signalintensität in den Wachstumskegeln von  $15.9 \pm 1.0$  AU, mit VPA stieg diese leicht, aber statistisch nicht signifikant auf  $16.5 \pm 1.3$  AU an. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 7 und Abbildung 11 graphisch dargestellt, Abbildung 12 zeigt beispielhafte Bilder von Wachstumskegeln mit  $Ca_v2.2$ -Antikörperfärbung.

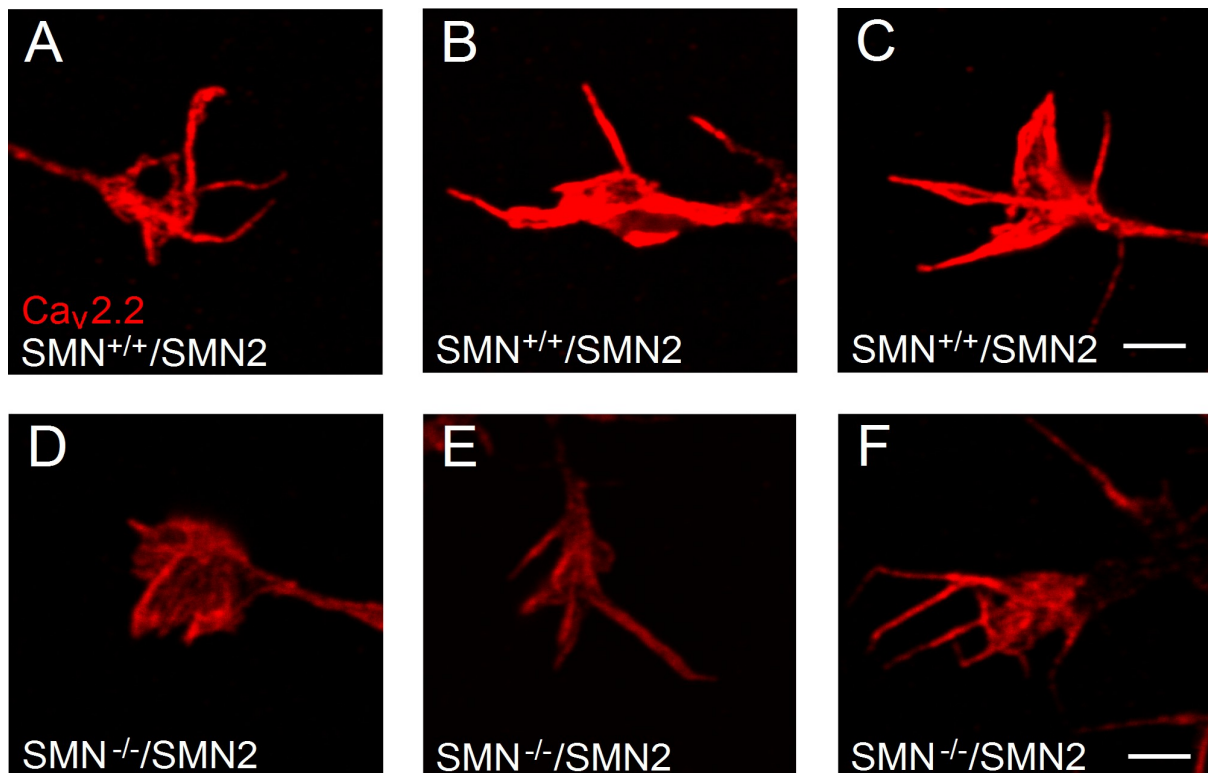
### **Ca<sub>v</sub>2.2- Verteilung in Wachstumskegeln**

|   | ohne Valproat [AU] | mit 100 $\mu$ M Valproat [AU] |
|---|--------------------|-------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | $32.1 \pm 2.1$ AU  | $31.9 \pm 1.6$ AU             |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | $15.9 \pm 1.0$ AU  | $16.5 \pm 1.3$ AU             |





**Tabelle 7 und Abbildung 11:** Tabellarische und graphische Darstellungen der Ca<sub>v</sub>2.2-Signalintensität in den Wachstumskegeln von *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneuronen mit Angabe der Standardabweichung. Zellen beider Genotypen wurden mit und ohne Behandlung mit 100 μM Valproat untersucht. VPA bewirkte keine Veränderung der Ca<sub>v</sub>2.2-Signalintensität. Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet.



**Abbildung 12:** Abbildungen der Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörperfärbungen gegen Ca<sub>v</sub>2.2-Kalziumkanäle (rot). Es werden jeweils typische Beispiele für *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2-Motoneurone (A-C) und für *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneurone (D-F) gezeigt. Die Valproat-Behandlung bewirkte bei den Smn-defizienten Zellen keine Veränderung der pathologisch erniedrigten Akkumulation der Kalziumkanäle. Die Länge der Maßstabballen beträgt 10 μm.

### **3.5 R-Roscovitine induziert eine Normalisierung der Signalintensität von $\beta$ -Aktin.**

Da sich in den Experimenten mit Valproat keinerlei Effekte auf Menge und Verteilung des Smn-Proteins sowie auf die Akkumulation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle gefunden hatten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde als nächster Schritt überprüft, in wie weit sich die Struktur des Zytoskeletts, insbesondere die Verteilung von  $\beta$ -Aktin, in Smn-defizienten Motoneuronen durch die Behandlung mit R-Roscovitine beeinflussen lässt, nachdem hierdurch eine Normalisierung der Akkumulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle in den Wachstumskegeln beobachtet werden konnte.

Smn-defiziente Motoneurone weisen eine Verminderung der  $\beta$ -Aktin-Anreicherung im Wachstumskegel auf (Rossoll et al., 2003; Jablonka et al., 2007; Moradi et al., 2017). Ursache hierfür ist eine verminderte Anreicherung von  $\beta$ -Aktin-mRNA in den Axonterminalen isolierter embryonaler Smn-defizienter Motoneurone durch Störungen im axonalen Transport der mRNA, der vom Smn-Protein abhängig ist.

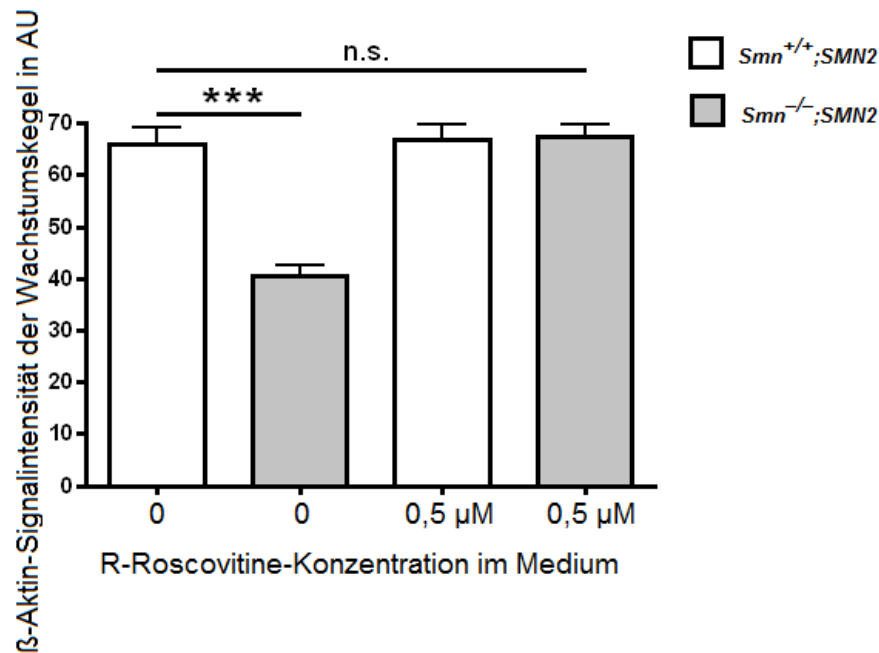
Fünf Tage lang auf Laminin-221 kultivierte Motoneurone wurden mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin gefärbt. Erneut wurden mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine behandelte *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneurone analysiert, sowie zur Kontrolle nur mit neurotrophen Faktoren behandelte Neurone beider Genotypen. Wiederum wurde die Signalintensität der einzelnen Pixel mit der AIDA-Software gemessen. Untersucht wurde die Verteilung von  $\beta$ -Aktin in den Wachstumskegeln. Auf die Analyse von Zellkörper und proximalem Axon wurde verzichtet, da sich der Defekt, den Smn-defiziente Motoneurone in der Anreicherung von  $\beta$ -Aktin ausbilden, nachweislich nur auf das distale Axon und den Wachstumskegel beschränkt (Rossoll et al., 2003).

*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneurone hatten ohne Behandlung mit R-Roscovitine eine  $\beta$ -Aktin-Signalintensität von  $66.0 \pm 3.1$  AU, während sie mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine eine Intensität von  $67.0 \pm 2.7$  AU aufwiesen. Dieser Unterschied erwies sich wiederum als nicht statistisch signifikant.

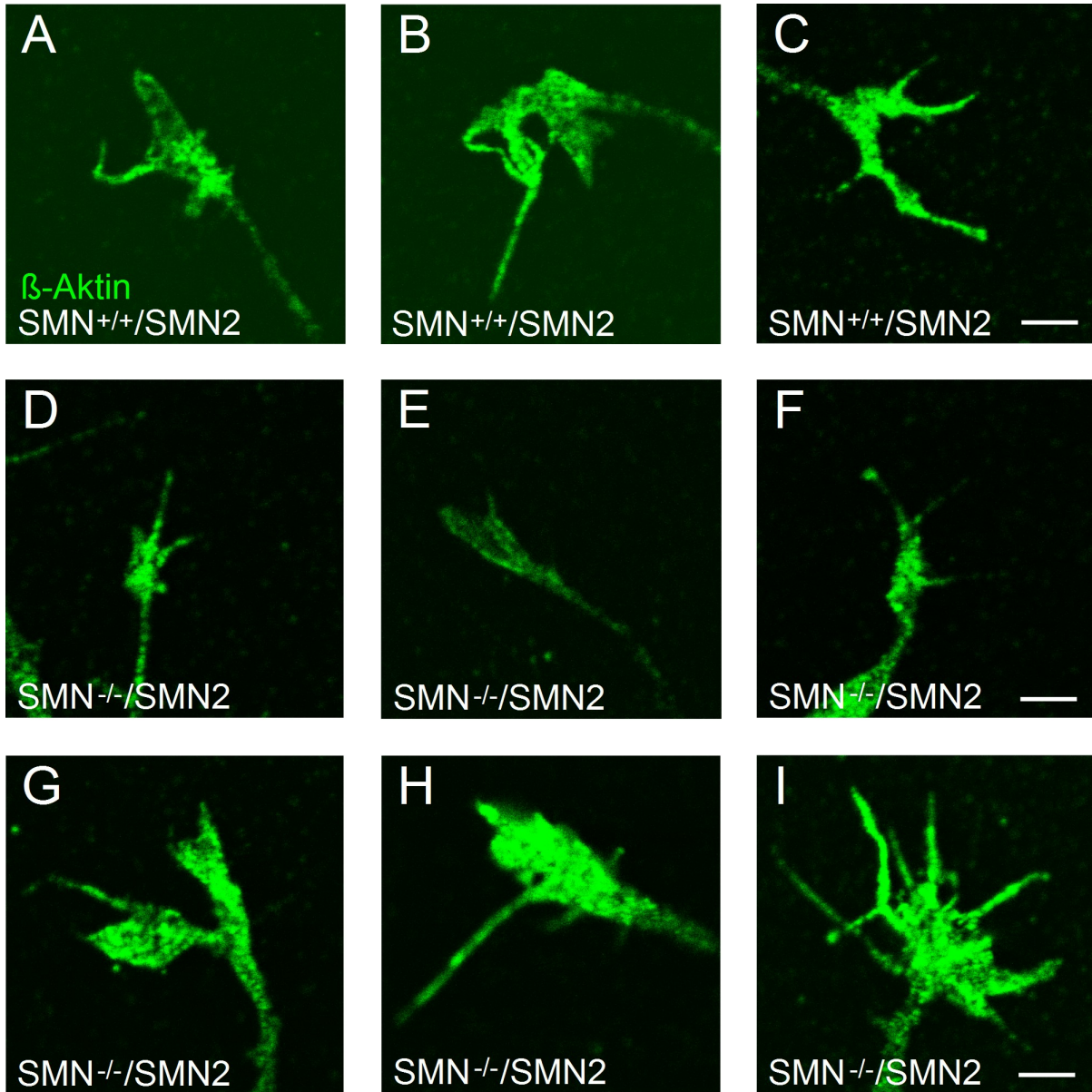
Im Gegensatz dazu ließ sich bei *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen ein Anstieg des  $\beta$ -Aktin-Signals von  $40.6 \pm 1.9$  AU ohne auf  $67.4 \pm 2.4$  AU mit R-Roscovitine-Behandlung feststellen. Die Smn-defizienten Motoneurone wiesen damit keinen signifikanten Unterschied mehr zu den Kontrollzellen auf. Die Ergebnisse der

Messungen sind in Tabelle 8 und Abbildung 13 graphisch dargestellt, Abbildung 14 zeigt beispielhafte Bilder von Wachstumskegeln mit immunzytochemischer Färbung gegen  $\beta$ -Aktin.

|   | ohne R-Roscovitine [AU] | mit 0,5 $\mu$ M R-Roscovitine [AU] |
|---|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | 66.0 $\pm$ 3.1 AU       | 67.0 $\pm$ 2.7 AU                  |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | 40.6 $\pm$ 1.9 AU       | 67.5 $\pm$ 2.4 AU                  |



**Tabelle 8 und Abbildung 13:** Tabellarische und graphische Darstellung der  $\beta$ -Aktin-Signalintensität im Wachstumskegel von *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneuronen mit und ohne Behandlung von 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine unter Angabe der Standardabweichung. Das  $\beta$ -Aktin-Signal der mit R-Roscovitine behandelten *Smn*-defizienten Motoneurone glich sich an das der Kontrollzellen an. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0.05$ . Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet. Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 60 Einzelmessungen gewonnen.



**Abbildung 14:** Abbildungen der Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin (grün). Es sind jeweils typische Beispiele für *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*-Motoneurone (A-C) sowie für unbehandelte (D-G) und mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine behandelte *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneurone (G-I) gezeigt. Die  $\beta$ -Aktin-Signalintensität von unbehandelten *Smn*-defizienten Neuronen ist gegenüber den Kontrollzellen signifikant herabgesetzt; dieser Defekt kann durch die Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine aufgehoben werden. Die Länge der Maßstabbalken beträgt 10  $\mu$ m.

### **3.6 R-Roscovitine vergrößert die Wachstumskegelfläche kultivierter *Smn*-defizienter Motoneurone.**

Wachstumskegel sind zu Beginn der Entwicklung wichtig für das axonale Längenwachstum, um das Zielgewebe - den Skelettmuskel - zu erreichen. Dort angekommen differenziert sich der Wachstumskegel zum präsynaptischen Bereich der neuromuskulären Endplatte. *Smn*-defiziente Neurone bilden verglichen mit Kontrollzellen *in vitro* deutlich kleinere Wachstumskegel aus (Rossoll et al., 2003). Nachdem in den vorangegangenen Experimenten nachgewiesen werden konnte, dass eine Behandlung mit R-Roscovitine bei *Smn*-defizienten kultivierten Motoneuronen die Störungen sowohl der Cluster-Formation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle als auch der Signalintensität von  $\beta$ -Aktin beseitigen kann, wurde nun der Einfluss von R-Roscovitine auf das Größenwachstum des gesamten Wachstumskegels untersucht. Hierzu wurden die Flächen der Wachstumskegel sowohl bei *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*<sup>-</sup>, als auch bei *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneuronen vermessen.

Von den drei Isoformen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin ist  $\beta$ -Aktin diejenige, die in den Axonterminalen für die Dynamik und die präsynaptische Differenzierung wichtig ist (Moradi et al., 2017).  $\beta$ -Aktin ist in den Axonterminalen sehr gut detektierbar und in den Wachstumskegeln *Smn*-defizienter Motoneurone signifikant reduziert (Rossoll et al., 2003; Jablonka et al., 2007, Moradi et al., 2017). Auch die Wachstumskegelfläche dieser Neurone ist signifikant kleiner. Nachdem sich die Signalintensität von  $\beta$ -Aktin in den Wachstumskegeln *Smn*-defizienter Motoneurone durch R-Roscovitine normalisiert, wurde nun überprüft, ob sich hierdurch die Größe der Wachstumskegel insgesamt ändert.

Zudem wurden nun auch niedrigere Konzentrationen von R-Roscovitine im Medium untersucht. Neben den für die vorangegangenen Experimente verwendeten 0,5  $\mu$ M wurden die Effekte von R-Roscovitine zusätzlich auch in Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M beobachtet.

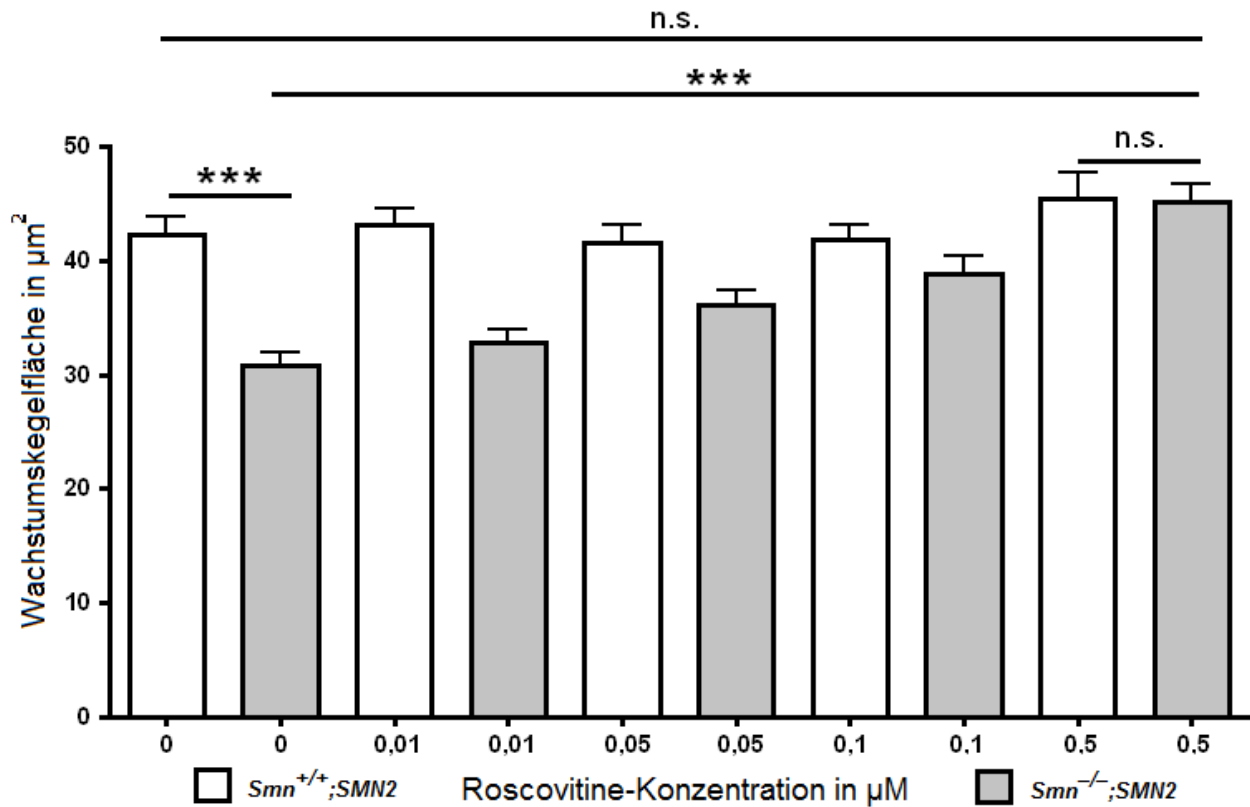
Fünf Tage lang auf Laminin-221 kultivierte Motoneurone wurden mit Antikörpern gegen das Zytoskelettprotein  $\beta$ -Aktin sowie gegen das axonspezifische tau-Protein angefärbt. Es wurden *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*<sup>-</sup> und *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Kulturen ohne R-Roscovitine sowie mit R-Roscovitine-Konzentrationen von 0,01  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M analysiert. Wie bei den vorangegangenen Experimenten wurden alle Kulturen mit

neurotrophen Faktoren versorgt. Um die Fläche der Wachstumskegel sicher identifizieren zu können, wurde bei der Messung darauf geachtet, nur solche Bereiche zu berücksichtigen, in denen sich das  $\beta$ -Aktin-Signal des Wachstumskegels deutlich von dem des tau-gefärbten Axons hervorhebt.

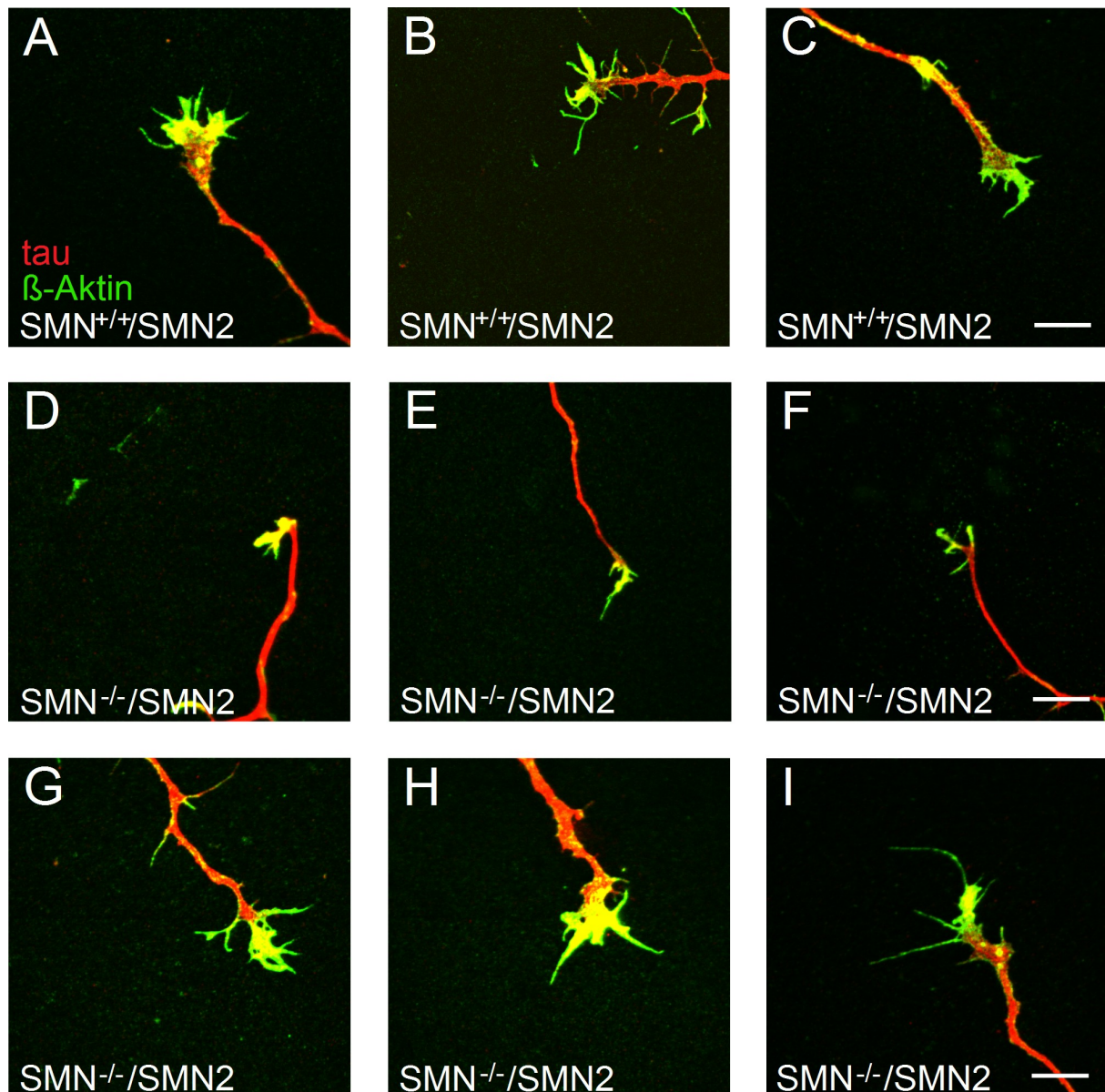
Die Fläche der Wachstumskegel bei *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Motoneuronen vergrößerte sich in Abhängigkeit von der R-Roscovitine-Konzentration im Medium nur geringfügig und nicht signifikant. Motoneurone dieses Genotyps, die nur mit neurotrophen Faktoren behandelt worden waren, hatten eine Wachstumskegelfläche von  $42.2 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$ ; diese blieb bis hin zu  $0,5 \mu\text{M}$  R-Roscovitine mit  $45.3 \pm 2.4 \mu\text{m}^2$  weitgehend konstant. Bei den *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen ließ sich eine deutliche Zunahme der Fläche der Wachstumskegel beobachten, die sich interessanterweise gleichmäßig über die untersuchten R-Roscovitine-Konzentrationen erstreckte. Die Fläche wuchs von  $30.7 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$  bei unbehandelten Zellen um etwa die Hälfte auf  $45.1 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$  bei mit  $0,5 \mu\text{M}$  R-Roscovitine behandelten Motoneuronen. Hierbei bestand – vergleichbar mit den vorangegangenen Ergebnissen – kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Kontrollzellen und den mit  $0,5 \mu\text{M}$  R-Roscovitine behandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen. Die Ergebnisse der Messungen werden im Folgenden tabellarisch (Tab. 9) und graphisch (Abb. 15) dargestellt; Abbildung 16 zeigt typische Beispiele für die Wachstumskegel von Kontrollzellen sowie von unbehandelten und behandelten *Smn*-defizienten Motoneuronen.

|   | ohne<br>R-Roscovitine        | 0,01 $\mu\text{M}$<br>R-Roscovitine | 0,05 $\mu\text{M}$<br>R-Roscovitine | 0,1 $\mu\text{M}$<br>R-Roscovitine | 0,5 $\mu\text{M}$<br>R-Roscovitine |
|---|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | $42.2 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$ | $43.1 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$        | $41.6 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$        | $43.1 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$       | $45.4 \pm 2.4 \mu\text{m}^2$       |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | $30.7 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$ | $32.8 \pm 1.2 \mu\text{m}^2$        | $36.2 \pm 1.2 \mu\text{m}^2$        | $38.9 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$       | $45.1 \pm 1.6 \mu\text{m}^2$       |

**Tabelle 9:** Mittelwerte der Flächen der Wachstumskegel von mit unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine behandelten *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen unter Angabe der Standardabweichung. Die Fläche der Wachstumskegel der *Smn*-defizienten Motoneurone glich sich mit steigender R-Roscovitine-Konzentration im Medium an die Kontrollzellen an. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0.05$ . Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 60 Einzelmessungen gewonnen.



**Abbildung 15:** Graphische Darstellung der Flächen der Wachstumskegel von *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneuronen in Abhängigkeit von ihrer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von R-Roscovitine. Bei einer Konzentration von 0,5 µM R-Roscovitine im Medium war im Gegensatz zu unbehandelten Zellen kein Unterschied mehr im Wachstumsverhalten zwischen Kontrollzellen und *Smn*-defizienten Zellen nachweisbar. Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\*, nicht signifikante Unterschiede mit n.s. gekennzeichnet.



**Abbildung 16:** Abbildungen der Wachstumskegel kultivierter Motoneurone mit Antikörperfärbungen gegen das axonspezifische tau-Protein (rot) sowie gegen  $\beta$ -Aktin (grün). Es sind jeweils typische Beispiele für *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*-Motoneurone (A-C) und für unbehandelte (D-F) sowie mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine behandelte *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneurone (G-I) abgebildet. Die Wachstumskegel der unbehandelten *Smn*-defizienten Neurone sind gegenüber denen der Kontrollzellen deutlich verkleinert; dieser Defekt kann durch die Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine ausgeglichen werden. Die Länge der Maßstabsbalken beträgt 15  $\mu$ m.



### **3.7 R-Roscovitine normalisiert das Längenwachstum der Axone *Smn*-defizienter Motoneurone.**

Angesichts der Ergebnisse der vorangegangenen Experimente konnte angenommen werden, dass sich die Binnenstruktur der Wachstumskegel *Smn*-defizienter Motoneurone durch eine Behandlung mit R-Roscovitine zumindest hinsichtlich wesentlicher Bestandteile weitgehend normalisiert. Nun stellte sich die Frage, ob es hierdurch auch zu einer Beeinflussung des Längenwachstums des gesamten Axons kommt. *Smn*-defiziente Motoneurone zeigen auf Laminin-221 ein verlängertes axonales Wachstum (Jablonka et al. 2007), da das von der Interaktion spannungsabhängiger Kalziumkanäle mit Laminin-221 abhängige Differenzierungssignal nicht ausgelöst wird. Um das Wachstumsverhalten der Axone von *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2- und *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneuronen zu untersuchen, wurden diese sieben Tage auf Laminin-221 kultiviert und danach mit Antikörpern gegen das axonspezifische tau-Protein gefärbt. Für beide Genotypen wurden Kulturen analysiert, die nicht mit Roscovitine behandelt worden waren, sowie solche, die R-Roscovitine-Konzentrationen von 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM und 0,5 µM im Medium ausgesetzt wurden.

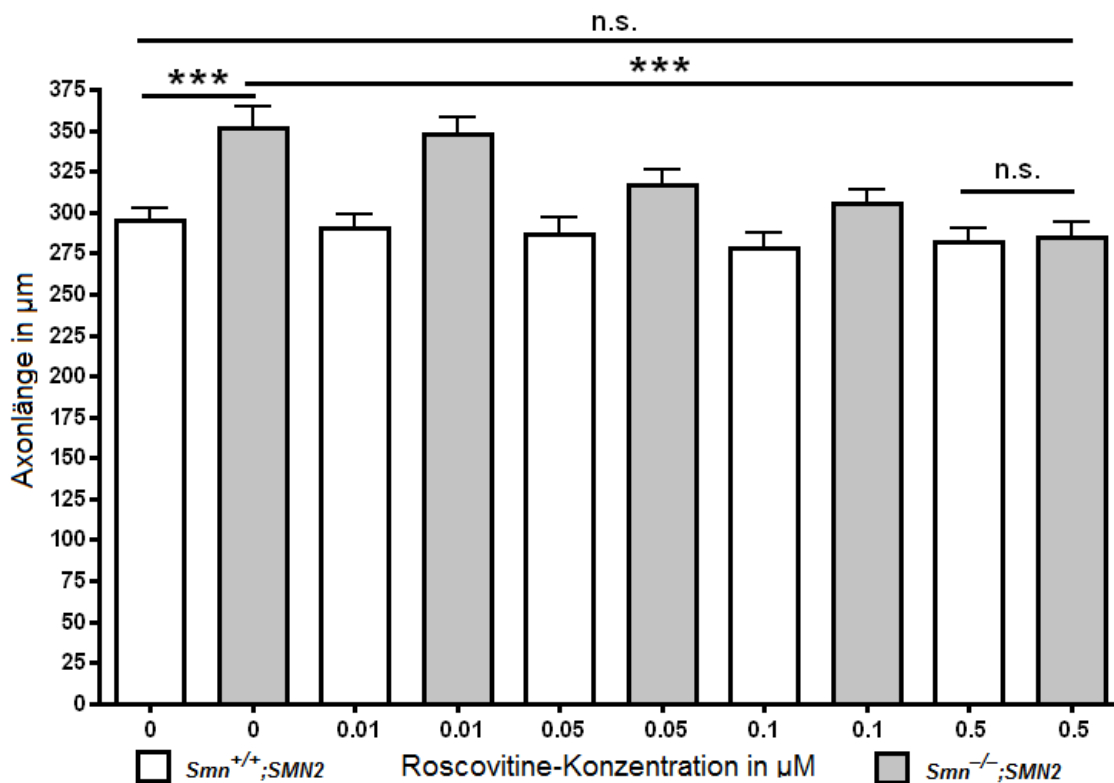
Wie bei allen vorangegangenen Experimenten konnte bei den Kontrollzellen zwischen den untersuchten Konzentrationen von R-Roscovitine kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten detektiert werden. *Smn*<sup>+/+</sup>;SMN2-Motoneurone hatten ohne Behandlung mit R-Roscovitine eine Länge von  $295.3 \pm 7.6$  µm, während sie mit 0,5 µM R-Roscovitine eine Länge von  $281.6 \pm 8.6$  µm aufwiesen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Wachstumsverhalten der *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneurone eine deutliche Verkürzung der Axone. Die Längenabnahme trat hierbei – vergleichbar der Größenzunahme der Wachstumskegel – gleichmäßig und analog der steigenden R-Roscovitine-Konzentration auf. Die nur mit neurotrophen Faktoren behandelten *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2-Motoneurone wiesen eine Axonlänge von  $351.4 \pm 13.0$  µm auf, diese verkürzte sich durch die Behandlung mit R-Roscovitine auf  $284.9 \pm 9.4$  µm unter 0,5 µM R-Roscovitine. Somit normalisierte sich auch das Längenwachstum *Smn*-defizienter Motoraxone durch eine Behandlung mit 0,5 µM R-Roscovitine auf die Länge der Motoraxone von Kontrollzellen. Tabelle 10 und Abbildung 17 zeigen

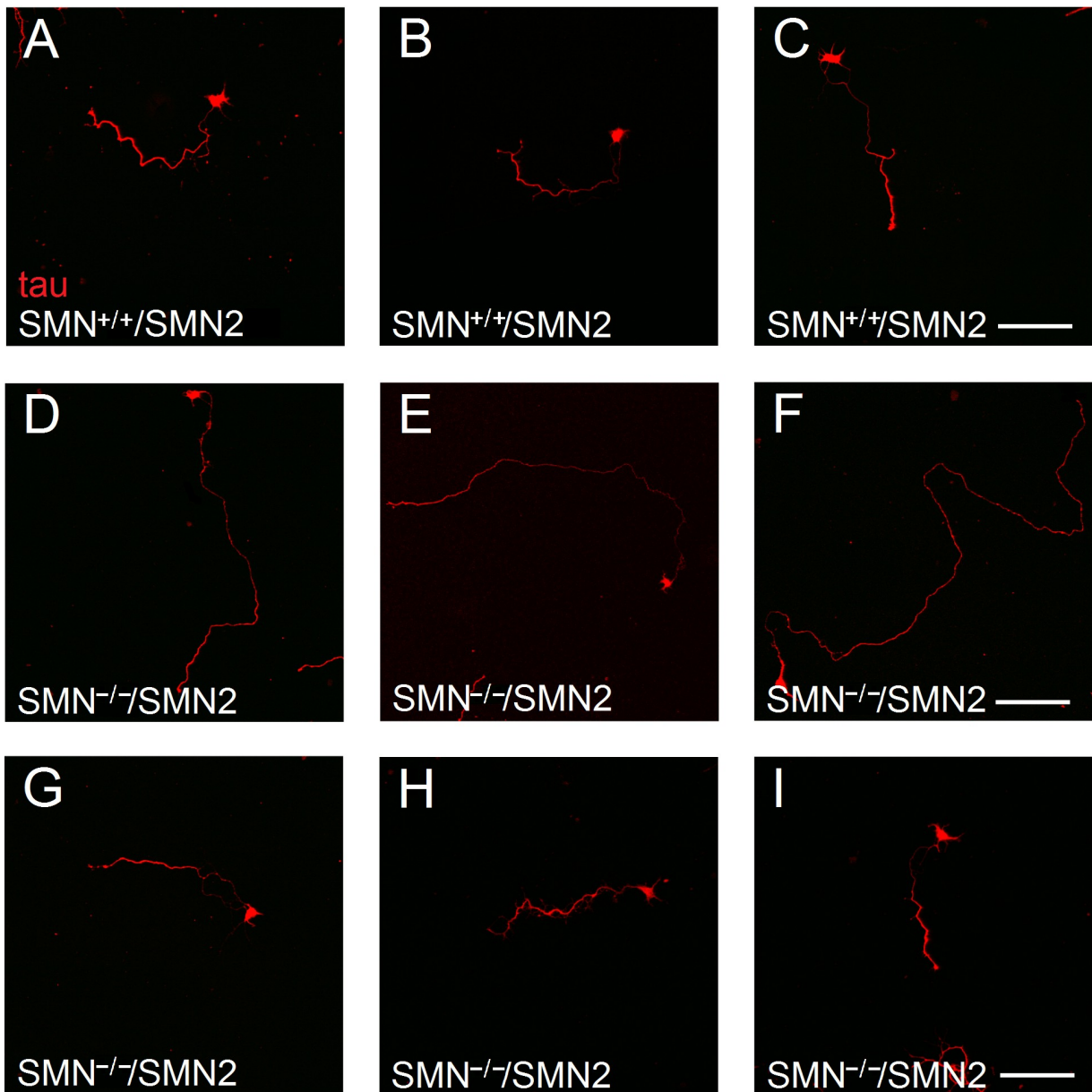
die Messergebnisse, Abbildung 18 typische Beispiele für Morphologie und Axonlänge.

|   | ohne<br>R-Roscovitine    | 0,01 $\mu$ M<br>R-Roscovitine | 0,05 $\mu$ M<br>R-Roscovitine | 0,1 $\mu$ M<br>R-Roscovitine | 0,5 $\mu$ M<br>R-Roscovitine |
|---|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Smn</i> <sup>+/+</sup> ; <i>SMN2</i> | 295.3 $\pm$ 7.6 $\mu$ m  | 290.8 $\pm$ 8.5 $\mu$ m       | 287.1 $\pm$ 9.8 $\mu$ m       | 278.6 $\pm$ 8.6 $\mu$ m      | 281.6 $\pm$ 8.6 $\mu$ m      |
| <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> | 351.4 $\pm$ 13.0 $\mu$ m | 347.9 $\pm$ 10.3 $\mu$ m      | 316.4 $\pm$ 9.6 $\mu$ m       | 305.6 $\pm$ 8.7 $\mu$ m      | 284.9 $\pm$ 9.4 $\mu$ m      |

**Tabelle 10:** Tabellarische Darstellung des Wachstumsverhalten der Axone von *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneuronen in Abhängigkeit ihrer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von R-Roscovitine bei Angabe der Standardabweichung. Die Axonlänge der *Smn*-defizienten Motoneurone glich sich mit steigender R-Roscovitine-Konzentration im Medium an die der Kontrollzellen an. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0.05$ . Die Daten wurden in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils mindestens 60 Einzelmessungen gewonnen.



**Abbildung 17:** Graphische Darstellung des Wachstumsverhalten der Axone von *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*- und *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneuronen in Abhängigkeit ihrer Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von R-Roscovitine. Bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine im Medium war im Gegensatz zu unbehandelten Zellen kein Unterschied mehr im Wachstumsverhalten zwischen Kontroll- und *Smn*-defizienten Zellen zu erkennen. Statistisch hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test) wurden mit \*\*\* gekennzeichnet.



**Abbildung 18:** Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Motoneurone mit Antikörpern gegen das axonspezifische tau-Protein (rot). Es sind jeweils typische Beispiele für *Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*-Motoneurone (A-C) sowie für unbehandelte (D-F) und mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine behandelte *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*-Motoneurone (G-I) gezeigt. Das pathologische Längenwachstum der Axone *Smn*-defizienter Motoneurone normalisierte sich durch die Behandlung mit 0,5  $\mu$ M R-Roscovitine. Die Länge der Maßstabbalken beträgt 100  $\mu$ m.

## **4. Diskussion**

Die spinale Muskelatrophie ist eine monogenetische Erkrankung, die bereits im Kindesalter aufgrund einer Degeneration spinaler und bulbärer Motoneurone zur Atrophie der Skelettmuskulatur führt und entsprechend ihrem Schweregrad nicht selten einen tödlichen Verlauf nimmt (Pearn 1978; Munsat und Davies 1992; Lunn und Wang 2008). Der Schweregrad der Erkrankung hängt vor allem von der Expressionshöhe des biologisch vollständig wirksamen untrunkierten SMN-Proteins in Motoneuronen ab, dessen Menge wiederum von der Kopienzahl des alternativ gespleißten *SMN2*-Gens bestimmt wird (Lefebvre et al., 1995; Lorson und Androphy, 2000; Burghes, 1997). Die für meine Arbeit durchgeführten Experimente beschäftigen sich mit der Frage, ob es eine von der Menge des SMN-Proteins unabhängige therapeutische Strategie gibt, die den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen kann. Hierzu habe ich zwei Substanzen verglichen: R-Roscovitine, einen Aktivator bzw. Modulator der spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom N-Typ und P/Q-Typ, welcher zudem eine CDK-inhibierende Wirkung besitzt, sowie Valproat (VPA), einen HDAC-Inhibitor, der eine stimulierende Wirkung auf die SMN-Transkription hat und somit auch die Produktion von Transkripten des *SMN2*-Gens positiv beeinflussen kann.

In den durchgeführten Experimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass die Applikation von R-Roscovitine in niedrigeren Konzentrationen von kultivierten  $\alpha$ -Motoneuronen gut toleriert wird, wohingegen es in höheren Konzentrationen zum Absterben der Motoneurone kommt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Anwendung von R-Roscovitine auf kultivierte embryonale Motoneurone aus einem Mausmodell für SMA Typ I (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*, „low copy“; beschrieben von Monani et al., 2000) zu einer Wiederherstellung des normalen, von Kontrollzellen (*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*) gezeigten Wachstums- und Differenzierungsverhaltens führt (Rossoll et al., 2003; Jablonka et al., 2007). Die Menge an Smn-Protein in diesen Zellen verändert sich durch die Behandlung mit R-Roscovitine jedoch nicht. Die Anwendung von Valproat auf neuronale Stammzellen (NSCs) des Genotyps *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2* führte über eine verstärkte Transkription des *SMN2*-Gens zu einer erhöhten Menge an Smn-Protein in diesen Zellen (Rak et al., 2009). In Analysen isolierter embryonaler Motoneurone im Rahmen meiner Arbeit bewirkte VPA jedoch keinen Anstieg der Smn-Proteinmenge

und folgerichtig auch keine Verbesserung des Differenzierungsverhaltens Smn-defizienter Motoneurone. Diese Beobachtungen sollen im Folgenden diskutiert und in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet werden.

#### ***4.1 Einfluss von R-Roscovitine auf das Überleben kultivierter Motoneurone: kommt es zur Induktion von Apoptose?***

Die Behandlung von Motoneuronkulturen mit R-Roscovitine in Konzentrationen von 10 bis 50  $\mu\text{M}$  führte zu einem starken Absinken der Zellüberlebensraten bis hin zum fast völligen Absterben der Kulturen binnen einer Woche. Die Verringerung des zellulären Überlebens war hochsignifikant und unterlag nur geringen Schwankungen von Experiment zu Experiment, so dass mangelnde experimentelle Routine als Ursache unwahrscheinlich wirkt. Noch wichtiger scheint, dass der Zelltod der Motoneurone erst verzögert nach drei bis fünf Tagen in Zellkultur in Erscheinung trat. Dieser zeitliche Verlauf lässt vermuten, dass R-Roscovitine anders als Glutamat keinen direkten toxischen Effekt auf Motoneurone ausübt; letzteres kann zum vollständigen Absterben der Motoneurone innerhalb von 24 Stunden führen (Fryer et al., 1999). Eher ist von einer verzögerten Induktion von Apoptose durch R-Roscovitine auszugehen, was über beide Wirkungen von R-Roscovitine vermittelt sein könnte. Durch CDK-Inhibition konnte bei neutrophilen Granulozyten eine proapoptotische Wirkung von R-Roscovitine nachgewiesen werden (Leitch et al., 2010). Aber auch ein übermäßiger, durch die hohen R-Roscovitine-Konzentrationen ausgelöster übermäßiger Kalziumeinstrom kann Apoptose induzieren, ähnlich wie bei der vor allem durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Glutamat-Toxizität. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wird als wichtiger Faktor in der apoptotischen Signalkaskade angesehen. Für intra- und extrazelluläre Kalziumchelatbildner, Kalziumkanalblocker und Antagonisten von Calmodulin, einem kalziumabhängigen Aktivator des proapoptotisch wirksamen Calcineurin, wurden antiapoptotische Effekte beschrieben (McConkey und Orrenius, 1996). Darüber hinaus existieren kalziumabhängige nukleäre Serinproteasen, die unabhängig von CDKs zur Aktivierung von Endonukleasen und somit zur Einleitung der Apoptose befähigt sind (Zhivotovsky et al., 1995; McConkey, 1996). Natürlich ist die Hypothese einer Induktion von Apoptose durch R-Roscovitine noch spekulativ und müsste durch

weitere Experimente bestätigt werden, wie beispielsweise eine Untersuchung der Aktivierung von apoptosespezifischen Proteinen.

Bei weiteren Experimenten wurde R-Roscovitine in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt (bis maximal 0.5  $\mu$ M Endkonzentration im Zellkulturmedium). Ein negativer Effekt auf das Zellüberleben war hier nicht mehr zu beobachten. Allerdings ließ sich auch kein zytoprotektiver Effekt nachweisen, wie er im Vorfeld durch R-Roscovitine beschrieben worden war (Appert-Collin et al., 2006). In einer Zellkultur primärer embryonaler Motoneurone kann durch Entzug neurotropher Faktoren die Apoptose der Neurone ausgelöst werden, was mit dem Versuch der postmitotischen Neurone, wieder in den Zellzyklus einzutreten, erklärt wurde (Maiese und Chong 2004). Die Überlebensraten konnten durch Einsatz von mehreren CDK-Inhibitoren, unter anderem R-Roscovitine in einer mit den hier vorliegenden Experimenten vergleichbaren Konzentration, erhöht werden. Als ursächlich für diese Beobachtung wird die Inhibition der für die apoptotische Kaskade relevanten CDKs angesehen (Appert-Collin et al., 2006). Allerdings unterscheiden sich diese Untersuchungen in wichtigen Punkten von den Experimenten im Rahmen meiner Arbeit: einerseits wurde kein insgesamt vermehrtes Überleben der Motoneurone beschrieben, sondern eine an Kontrollbedingungen angeglichenes Differenzierungsverhalten Smn-defizienter Motoneurone, was sich methodisch deutlich von der reinen Bestimmung von Überlebensraten unterscheidet; andererseits war der Beobachtungszeitraum mit 24 Stunden deutlich kürzer.

#### ***4.2 Die Normalisierung des Phänotyps Smn-defizienter kultivierter Motoneurone durch R-Roscovitine: ein kalziumabhängiger Prozess.***

Nach der Beobachtung der morphologischen Normalisierung der Differenzierung der axonalen Wachstumskegel bei primären Smn-defizienten Motoneuronen im Bezug auf Größe sowie Akkumulation von Beta-Aktin und spannungsabhängigen Kalziumkanälen durch Applikation von R-Roscovitine stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus diese zustande kommt. Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kann man einen über die Menge des Smn-Protein vermittelten Effekt ausschließen; weder hatten sich im Vorfeld Hinweise auf eine Beeinflussung der Smn-Proteinmenge durch R-Roscovitine ergeben, noch wurde eine solche in

dieser Arbeit nachgewiesen. Nichts desto trotz wurde auch ein Einfluss auf die Transkription neuronaler Proteine durch CDK5 und deren Inhibition durch R-Roscovitine beschrieben. Dieser Effekt war zusätzlich abhängig von BDNF (Kino et al., 2007 und 2010). Unter diesen Gesichtspunkten war es wichtig zu klären, ob R-Roscovitine einen Einfluss auf die Produktion und Stabilität des Smn-Proteins hat. Der beobachtete Effekt könnte grundsätzlich sowohl über die CDK-Inhibition als auch über die Stimulation spannungsabhängiger Kalziumkanälen durch R-Roscovitine bewirkt werden. Zumindest spielen beide Proteine bei der Differenzierung von Motoneuronen und vor allem deren präsynaptischen Strukturen eine relevante Rolle. Die CDK5 ist für die Differenzierung und Funktion der neuronalen Endplatte bedeutsam. Eine Inhibition von CDK5 führt zur Beschleunigung der Endozytose präsynaptischer Vesikel (Tomizawa et al., 2003). Zudem wurde gezeigt, dass durch Inhibition von CDK5 mit R-Roscovitine sowohl ruhende Synapsen aktiviert werden als auch eine übermäßige Freisetzung präsynaptischer neurotransmitterhaltiger Vesikel bewirkt wird (Kim und Ryan, 2010). Während auch unter elektrischer Überstimulation der Neuronen üblicherweise nur etwa 50 Prozent der präsynaptischen Vesikel freigesetzt werden, kommt es durch Inhibition von CDK5 zu einem Anstieg auf bis zu 90 Prozent der Vesikel. Im Gegensatz nimmt die präsynaptische CDK5-Aktivität deutlich ab, wenn die Neuronen inaktiv sind (Kim und Ryan, 2010). Als physiologischer Gegenspieler der CDK5 wirkt Calcineurin, was die Transmitterfreisetzung stimuliert. Somit scheint CDK5 physiologischerweise eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung und den Stoffwechsel von Neurotransmittern zu besitzen (Kim und Ryan, 2010). Darüber hinaus wird die Stabilisierung und Differenzierung des Wachstumskegels in eine Präsynapse während der neuronalen Entwicklung durch Acetylcholin über einen CDK5-abhängigen Mechanismus negativ beeinflusst (Lin et al., 2005). Auch das Wachstum von Axonen und Wachstumskegeln wird CDK5-vermittelt gesteuert (Hahn et al., 2005). Kultivierte Motoneurone aus dem verwendeten Mausmodell für SMA Typ I weisen gegenüber Kontrollzellen keine erhöhte Menge an CDK5 auf, auch scheint die Behandlung mit R-Roscovitine keinen Einfluss auf die Menge an CDK5 zu nehmen (unveröffentlichte Daten). Somit stellt sich die Frage, inwieweit die Inhibition von CDK5 durch R-Roscovitine Einfluss auf das verbesserte Differenzierungsverhalten von axonalen Wachstumskegeln bei Smn-defizienten Motoneuronen hat. Es wurden daher primäre

Smn-defiziente Motoneurone mit S-Roscovitine behandelt, was ausschließlich eine CDK-Inhibition bewirkt und keinen Einfluss auf spannungsabhängige Kalziumkanäle besitzt. Unter S-Roscovitine wurden keine Änderungen des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens der Axonterminalen bei Smn-defizienten Motoneuronen beobachtet (unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beobachteten Effekte auf die Stimulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle durch R-Roscovitine zurückzuführen sind.

Lokale Kalziumeinströme sind sowohl für die Reifung als auch für die Funktion neuromuskulärer Endplatten von großer Bedeutung. So sind lokale Kalziumeinströme bei auf Synapsen-spezifischem Laminin-221 kultivierten Motoneuronen im Vergleich zum Wachstum auf Laminin-111 erhöht. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Axone von auf Laminin-221 kultivierten Motoneuronen bei Blockade der Kalziumkanäle mit  $\omega$ -Conotoxin verändert auswachsen (Jablonka et al., 2007). Synapsen-spezifische Laminine tragen die sogenannte  $\beta$ 2-Kette, die direkt an spannungsabhängige Kalziumkanäle bindet, was zu deren Akkumulation in der Axonterminalen (Nishimune et al., 2004) und somit zu erhöhten Kalziumeinströmen nach Depolarisation durch Aktionspotentiale führt (Jablonka et al., 2007). Dies wiederum hat ein korrektes axonales Auswachsen und somit eine geregelte neuronale Differenzierung der Axonterminalen zur Folge (Jablonka et al., 2007); insbesondere führt diese Interaktion zur Inhibition weiteren axonalen Wachstums und zur präsynaptischen Differenzierung der Neurone (Sann et al., 2008). Im Gegenzug bewirkt eine Blockade der Interaktion zwischen der  $\beta$ 2-Kette der Laminine und den  $Ca_v2.2$ -Kanälen *in vivo* bei Embryonen des Krallenfroschs *Xenopus laevis* ein vermehrtes Auswachsen sensorischer Nervenendplatten, da in den Neuronen keine präsynaptischen Differenzierungssignale ausgelöst werden können (Sann et al., 2008). Die durch R-Roscovitine modulierbaren spannungsabhängigen Kalziumkanäle  $Ca_v2.1$  und  $Ca_v2.2$  sind nicht nur wichtig für die korrekte Ausbildung der neuromuskulären Endplatten, sondern spielen auch bei deren Funktionalität eine wichtige Rolle. Vornehmlich  $Ca_v2.1$  ist postnatal im Bereich der aktiven Zonen, den Bereichen der präsynaptischen Vesikelfreisetzung, angesiedelt. Somit wären weiterführende Experimente denkbar, die die Vesikelfreisetzung an den Endplatten Smn-defizienter Motoneurone untersuchen, insbesondere unter dem Gesichtspunkt, ob R-Roscovitine auch die Funktionalität der Endplatten verbessern kann.



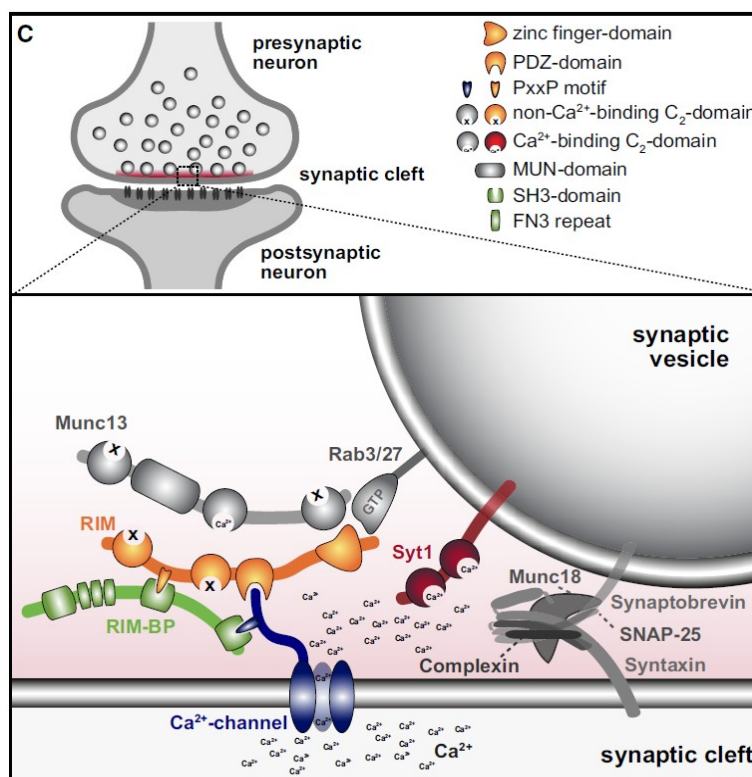
Neben den spannungsabhängigen Kalziumkanälen sind auch die transient receptor potential channels (TRP-Kanäle) sowie Kalziumsignale als second messenger für die Funktion der Präsynapse relevant.

Bislang wurden mehr als zwanzig Typen von TRP-Kanälen beschrieben. Es handelt sich um ubiquitär vorkommende Kationenkanäle, die als Eintrittspforte für Kalziumionen und andere Kationen eine zentrale Stellung für die Regulation der Erregbarkeit sowohl neuronaler als auch nicht-neuronaler Zellen einnehmen (Philipp et al., 1996; Montell et al., 2002). Obwohl die Kanäle der TRP-Familie untereinander deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Funktionsweise zeigen, sind sie hinsichtlich ihrer Sequenz und Struktur sehr ähnlich. Man unterscheidet bei Säugetieren sieben Untergruppen, von denen drei in Motoneuronen von besonderem Interesse sind: TRPC, TRPV und TRPM (Montell et al., 2002). Insbesondere für das Auswachsen von Filopodien, das Richtungswachstum der Axone und die Entwicklung und Differenzierung der Wachstumskegel von Motoneuronen sind offenbar lokalisierte Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels maßgeblich, die wiederum von den TRPC-Kanälen abhängig sind. Über diesen Mechanismus werden die chemotaktischen Signale von Netrin-1 (Tang und Kalil, 2005; Wang und Poo, 2005), von Myelin-assoziiertem Glykoprotein (MAG) und von BDNF (Li et al., 2005) vermittelt. Bei Inhibition der TRPC-Kanäle werden die beobachteten Effekte aufgehoben. Somit spielen diese Kanäle sowie die Kalziumhomöostase insgesamt offenbar eine zentrale Rolle in Wachstum und Differenzierung von Neuriten bei Motoneuronen; vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch bei Neuronen aus dem Hippocampus (Amaral und Pozzo-Miller, 2007). Somit stellen über TRP-Kanäle vermittelte Änderungen des intrazellulären Kalziumhaushalts möglicherweise einen generellen Antwortmechanismus auf externe, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren vermittelte Stimuli dar (Henley und Poo, 2004; Bezzerides et al., 2004). Auch das Überleben von Neuronen wird von TRP-Kanälen positiv beeinflusst; im Gegenzug bewirkt deren Knockdown schwere postnatale Entwicklungsstörungen des ZNS und die Ausbildung einer progressiven Paralyse (Jia et al., 2007; Rodriguez-Santiago et al., 2007). Insgesamt scheint der Neurotrophin-induzierte Einbau von TRP-Kanälen in die Zellmembran somit nicht nur für Wachstum und Differenzierung sondern auch für das Überleben der Neurone von wichtiger Bedeutung zu sein.

Kultivierte Motoneurone, die keine Tropomyosin-Rezeptor-Kinasen vom Typ B (TrkB-Rezeptoren) exprimieren, weisen zu Smn-defizienten Motoneuronen vergleichbare morphologische und funktionale Defizite auf (Dombert et al., 2017). TrkB ist der hochaffine Rezeptor für den neurotrophen Faktor BDNF. Somit wäre eine Folgestudie über die Bedeutung des BDNF/TrkB-Signalweges, insbesondere über die Endozytose und den endosomalen Transport des aktivierten TrkB-Rezeptors in Smn-defizienten Motoneuronen höchst interessant. Im Zusammenhang mit den Einflüssen kalziumvermittelter Signalwege stellt sich insbesondere die Frage nach einer direkten Interaktion zwischen TrkB-Rezeptoren und TRPC-Kanälen in Motoneuronen. Eine solche wurde bislang jedoch nicht beschrieben, so dass die Rolle von TRPC-Kanäle in der Pathogenese der SMA letztlich noch völlig unklar ist. Allerdings könnte die Lokalisierung der Kanäle aufgrund der gestörten Architektur des Zytoskeletts im Wachstumskegel fehlerhaft sein. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet bleiben die genauen molekularen Mechanismen bis heute jedoch ungeklärt. Weitere zellkulturelle Arbeiten an isolierten Motoneuronen können hier weiteren Aufschluss über die Rolle der TrkB-TRPC-Interaktion geben.

Darüber hinaus ist Kalzium als second messenger in der Funktion der Präsynapse von zentraler Bedeutung. So aktivieren sich die Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinasen nach Bindung von Kalzium mittels Autophosphorylierung selbst. Ihnen wird eine wichtige Rolle in der neuronalen Funktionalität und Plastizität sowohl prä- als auch postsynaptischer Membranen zugeschrieben, in beiden Arealen finden sich große Mengen dieser Enzyme (Malinow et al., 1989; Silva et al., 1992; Braun und Schulman, 1995; Mayford et al., 1995; Lisman et al., 2002; Reviews: Leenders und Sheng, 2005; Yamamoto et al., 2003). Im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit behandelten Fragestellung sind vor allem die Vorgänge in der Präsynapse von Interesse. Hier konnten die Synapsine als ein Interaktionspartner der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinasen identifiziert werden (Yamamoto et al., 2003). Synapsine sind neuronale Phosphoproteine und sowohl mit präsynaptischen Vesikeln als auch mit dem Zytoskelett – insbesondere auch mit Aktin – assoziiert. Sie sind für die Neurotransmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Membran durch Kontrolle der zur Verfügung stehenden präsynaptischen Vesikel von großer Wichtigkeit. In Ruhe binden Synapsine die Vesikel ans Zytoskelett und verhindern so deren Fusion mit der Zellmembran. Bei synaptischer Aktivität werden die Synapsine

phosphoryliert, was zur Lösung der Vesikel vom Zytoskelett und letztendlich zur Freisetzung der Neurotransmitter führt. Hierfür sind unter anderem die Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinasen verantwortlich, wobei die Phosphorylierung von Synapsinen ein recht unspezifischer Prozess ist, an dem zahlreichen Kinasen beteiligt sein können (Benfenati et al., 1989; De Camilli et al., 1990; Greengard et al., 1993; Hilfiker et al., 1999). Nichts desto weniger zeigen Neurone, deren Synapsine nicht phosphoryliert werden können, Störungen in der Freisetzung präsynaptischer Vesikel und somit in ihrer neuronalen Funktionalität (Torri-Tarelli et al., 1992; Stefani et al., 1997; Hosaka et al., 1999).



**Abbildung 19:** Kalziumabhängige Freisetzung neurotransmitterhaltiger Vesikel in der Präsynapse mit Darstellung der zahlreichen Interaktionspartner bei diesem komplexen Prozess (Südhof, 2013).

Das phosphorylierte Synapsin ändert seine Konformation, was zur Lösung der Vesikel aus ihrer Verankerung im präsynaptischen Zytoskelett führt. Nach der Anlagerung eines sekretorischen Vesikels an die Zellmembran bildet sich ein sogenannter SNARE-Komplex. Er besteht aus Molekülen, die teils in der Zellmembran (SNAP-25 und Syntaxin), teils in der Vesikelmembran (Synaptobrevin)

verankert sind. Durch die Bildung des Komplexes heften sich beide Membranen aneinander. Synaptobrevin rollt sich zu einer Helix auf und zieht damit die Membranen zueinander. Die Membranen fusionieren und der Vesikelinhalt entleert sich in den synaptischen Spalt. Proteine wie Munc13, RIM und RIM-BP stellen eine funktionelle Verbindung zwischen der GTPase Rab3/27 und den spannungsabhängigen Kalziumkanälen her (Südhof, 2013). Somit wird gewährleistet, dass Kalzium, welches durch die an den aktiven Zonen lokalisierten spannungsabhängigen Kalziumkanäle (N-(Ca<sub>v</sub>2.2) und P/Q-(Ca<sub>v</sub>2.1) Typ) einströmt, sich im Bereich der Membranfusion akkumuliert. Hier könnte man postulieren, dass der durch R-Roscovitine erhöhte Kalziumeinstrom sich positiv auf die verminderte Neurotransmission an Smn-defizienten neuromuskulären Endplatten (Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010; Tejero et al., 2016) auswirkt.

Auch die Proteinkinase A ist in ihrer Funktion abhängig von Kalzium. Durch Aktivierung einer kalziumsensitiven Adenylatzyklase im Bereich der präsynaptischen Membran entsteht dort ein erhöhter cAMP-Spiegel, was wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A führt. Hierdurch kann eine gesteigerte neuronale Aktivität, einhergehend mit der vermehrten Freisetzung präsynaptischer Vesikel beobachtet werden (Weisskopf et al., 1994; Salin et al., 1996; Kimura et al., 1998; Mengeon et al., 2006).

Ein dritter Interaktionspartner für Kalzium als second messenger ist die Proteinkinase C. Diese wird wie die CaMKII durch Kalzium aktiviert. Der Einbau von Kalziumkanälen des Ca<sub>v</sub>2-Typs in die Plasmamembran wird über die aktive Proteinkinase C (PKC) gesteuert (Zhang et al., 2008). Darüber hinaus führt die Aktivierung der PKC zu vermehrter Freisetzung präsynaptischer Vesikel und vergrößert den Pool der zur Verfügung stehenden präsynaptischen Vesikel (Ghirardi et al., 1992; Stevens und Sullivan, 1998).

Riluzol wird effektiv in der Therapie von Patienten mit ALS verwendet. Klinisch wird ein langsames Fortschreiten der Erkrankung beobachtet, was auf einen neuroprotektiven Effekt zurückgeführt wird (Blasco et al., 2014). Neben anti-glutamatergen Effekten aktiviert Riluzol spannungsabhängige, kalziumaktivierte Kaliumkanäle (SK-Kanäle), welche bei einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels zu einem Ausstrom von Kalium führen. Auch in Tiermodellen der SMA konnte eine Normalisierung des axonalen Wachstums und der

neuromuskulären Funktion durch Riluzol nachgewiesen werden; dieser Effekt war abhängig von den SK-Kanälen (Dimitriadi et al., 2013). In einem genetischen Screening mit SMA-Modellen der Fruchtfliege *Drosophila* und des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* fielen die Gene für die SK-Kanäle zudem als modifiziert auf. Allerdings ist ihre genaue Bedeutung ebenso wie der eigentliche Wirkmechanismus von Riluzol bislang nicht geklärt. Nichts desto trotz scheint hier ein weiteres, für die SMA möglicherweise relevantes kalziumabhängiges System zu existieren, welches sich eventuell auch für einen möglichen alternativen Therapieansatz anbietet (Russman et al., 2003; Dimitriadi et al., 2013). Es wurde zumindest auch eine veränderte Expression des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_v2.1$  an der Oberfläche *Smn*-defizienter Motoneurone beschrieben (Fletcher et al., 2017), was mit reduzierter synaptischer Überleitung einherging. Durch pharmakologische Stimulation der neuronalen Überleitung wurde in einem Mausmodell für die SMA eine Verbesserung der motorischen Störungen sowie eine Normalisierung der Expression des  $K_v2.1$ -Kaliumkanals beobachtet (Fletcher et al., 2017). Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der synaptischen Überleitung für die neuronale Funktion und Differenzierung.

Das Wachstums- und präsynaptische Differenzierungsverhalten der Kontrollzellen (*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*) wurde durch R-Roscovitine nicht beeinflusst, was darauf hinweist, dass die kalziumabhängige Differenzierung der Motoneurone bei Kontakt mit synapsen-spezifischem Laminin unmittelbar ausgelöst wird und durch zusätzliche Stimulation des Kalziumeinstroms nicht weiter beschleunigt werden kann. Dies erscheint sinnvoll, da *in vivo* über diesen Mechanismus die genaue Lokalisation der neuromuskulären Endplatten gewährleistet werden kann, was letztlich eine exakte neuronale Ansteuerung der einzelnen Muskelfasern ermöglicht. Diese Präzision wird vor allem in dicht innerviertem Muskelgewebe benötigt; beispielsweise versorgt in den inneren Augenmuskeln von Hühnern ein Axon nur vier Muskelfasern. Die relative Innervationsgröße ( $\mu\text{m}^2$  Endplattenfläche pro  $1.000.000 \mu\text{m}^3$  Muskelfaservolumen) beträgt hier den außergewöhnlichen Wert von über 10.000, was die Notwendigkeit einer genauen Platzierung der einzelnen Synapsen nochmals verdeutlicht (Zenker und Kramer, 1967).

Zusammenfassend spielt Kalzium bei der Differenzierung und Funktion der Präsynapse eine zentrale Rolle und steuert auf vielfältige Weise die neuronale Aktivität. Somit sind grundsätzlich mehrere Mechanismen denkbar, über die kalziumvermittelte Änderungen in der Architektur und Funktion von axonalen Wachstumskegeln erklärt werden können. Möglich wäre ein vermehrter Einbau von Kalziumkanälen in den aktiven Zonen der Wachstumskegel durch kalziumabhängige Aktivierung der Proteinkinase C. Eine andere mögliche Erklärung liefert der Einfluss auf den Haushalt von cAMP und die Proteinkinase A. Da eine Behandlung Smn-defizienter Motoneurone mit cAMP die morphologischen und funktionalen Defekte dieser Zellen ausgleichen kann (Jablonka et al., 2007), scheint es möglich, dass der durch R-Roscovitine beobachtete Effekt auf einen kalziumvermittelten Anstieg des cAMP-Spiegels in den Neuronen zurückzuführen ist.

Generell wird Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration eine bedeutsame Rolle bei der Steuerung des Auswachsens von Neuriten zugeschrieben. Postuliert wurde ein „optimaler Bereich“ des intrazellulären Kalziumspiegels für das Axonwachstum. Ausgehend davon wird im Allgemeinen verstärkter intrazellulärer Kalziumeinstrom mit Hemmung und dessen Blockade mit Förderung des Neuritenwachstums in Verbindung gebracht. Auch für die Stabilisierung und Differenzierung von Wachstumskegeln werden Veränderungen im Kalziumhaushalt verantwortlich gemacht. Eine zentrale Rolle scheint hierbei die direkte Wirkung von lokalen Kalziumeinströmen auf das Zytoskelett zu spielen. Im Kontext dieser Arbeit ist insbesondere der Nachweis einer Beeinflussung der Assemblierung und Dynamik des Aktin-Zytosketts durch Kalziumionen von Interesse. Allerdings muss gesagt werden, dass die vorliegenden Daten sowohl Stabilisierung als auch Depolymerisation der Aktinfilamente durch verstärkten intrazellulären Kalziumeinstrom erklären. Diese unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Amplitude und Frequenz des Einstroms (Welnhöfer et al., 1999; Tang et al., 2003; Reviews: Gomez und Spitzer, 2000; Henley und Poo, 2004; Gomez und Zheng, 2006). Auch scheint es - in erster Linie durch die Wiederherstellung der Erregbarkeit des Wachstumskegels - zu einer Steigerung der Translation lokal verfügbarer  $\beta$ -Aktin-mRNA zu kommen, was die Normalisierung der Signalintensität von  $\beta$ -Aktin erklären könnte. Zumindest ist die Translation dieser mRNA im Wachstumskegel Smn-defizienter Motoneurone ebenfalls gestört. Bei maximaler Stimulation der

Aktinsynthese lässt sich hingegen deren Phänotyp auch bei niedrigen Mengen von  $\beta$ -Aktin-mRNA im Wachstumskegel verbessern (Rathod et al., 2012).

### **4.3 Valproat-Behandlung zeigt nicht die erhofften Effekte auf *Smn*-defiziente Motoneurone.**

In Kulturen von Fibroblasten von SMA-Patienten sowie in wildtypischen Hippocampus- und PC12-Zellen wurde durch Valproat-Behandlung sowohl eine Steigerung der Expression von SMN-Protein als auch der Transkription von *SMN2*-mRNA beschrieben (Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003; Brichta et al., 2006; Bergeijk et al., 2006; Hahnen et al., 2006). Darüber hinaus regt VPA bei PC12-Zellen das Auswachsen von Neuriten an (Bergeijk et al., 2006). Erklärt wird die Steigerung der Expression von SMN-Protein mit der Inhibition der Histon-Deacetylase (HDAC) durch VPA. VPA bindet an das katalytische Zentrum der HDACs und inhibiert deren hemmenden Einfluss auf die Transkription durch Hyperacetylierung der N-terminalen Kette der Histone H3 und H4 (Gottlicher et al., 2001). Dies führt sowohl zur direkten als auch zur indirekten Aktivierung des *SMN2*-Promotors, wobei letztere über eine vermehrte Transkription der Transkriptionsfaktoren AP1 und SP2, welche an den *SMN2*-Promotor binden und ihn aktivieren, vermittelt wird. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung der Transkription des *SMN2*-Gens (Brichta et al., 2003). Als weiterer Effekt der HDAC-Inhibition durch VPA werden auch Spleißfaktoren wie SF2/ASF, SRp20 und Htra2- $\beta$ 1 vermehrt transkribiert (Brichta et al., 2003), wobei der Faktor Htra2- $\beta$ 1 mit Veränderungen im Spleißmuster von *SMN2* und vermehrter Expression des SMN-Proteins in Verbindung gebracht wird (Hofmann et al., 2000). Nachdem auch bei neuronalen Stammzellen des Genotyps *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2* bei Behandlung mit 100  $\mu$ M VPA eine erhöhte Menge an Smn-Protein nachgewiesen werden konnte (Rak et al., 2009), wurde nun der Effekt auf isolierte Smn-defiziente Motoneurone untersucht. Hierbei war keine Erhöhung der Smn-Proteinmenge festzustellen. Als Ursache hierfür sind unterschiedliche genetische Muster – humanes *SMN1*- bzw. murines *Smn*-Gen einerseits, humanes *SMN2*-Gen andererseits – und der damit verbundene unterschiedliche Einfluss der HDACs auf die *SMN*-Transkription bei den verwendeten Zellen zu berücksichtigen. Einen weiteren Erklärungsansatz bieten unterschiedliche Acetylierungsmuster und damit

verbundenes Ansprechen auf HDAC-Inhibitoren von NSCs und differenzierten Motoneuronen. Dies wurde auch beim unterschiedlichen Ansprechen auf VPA zwischen neuronalen (NSCs) und nicht neuronalen Zellen (embryonale Fibroblasten) beobachtet (Rak et al., 2009). Ein ganz wesentlicher Faktor dürfte darüber hinaus die Konzentration von VPA sein. Bei den erwähnten Experimenten mit Hippocampus-Schnittkulturen und PC12-Zellen wurde eine Anhebung der Smn-Proteinmenge erst bei VPA-Konzentrationen beobachtet, die um mindestens das zwanzigfache höher als die in dieser Arbeit verwendeten waren (2 mM und mehr) (Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003; Bergeijk et al., 2006; Brichta et al., 2006; Hahnen et al., 2006). Ohnehin scheint die Frage der VPA-Konzentration von zentraler Bedeutung bei der Verwendung dieser Substanz als potentiell Therapeutikum für die SMA im Patienten zu sein. In der klinischen Praxis wird die Dosierung von VPA entsprechend den langjährigen klinischen Erfahrungen mit dem Medikament als Antikonvulsivum und als Phasenprophylaktikum durch Bestimmung des Wirkstoffspiegels festgelegt, auch wenn die Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von VPA und dem biologischen Effekt insgesamt gering ist (Vajda 2000; Schmidt und Schachter 2014). Dennoch muss bei höheren Konzentrationen mit dem vermehrten Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen sowie toxischen Effekten gerechnet werden. Der Referenzbereich liegt zwischen 50 und 100 µg/ml Gesamtvalproat, entsprechend einer Konzentration von etwa 350 bis 700 nmol/ml (Vajda und Eadie, 2014). Da die Substanz *in vivo* zu 90% an Eiweiß gebunden ist, werden als Wirkstoffspiegel für freies Valproat im Serum Werte zwischen 5 und 15 µg/ml angenommen. Valproat hat eine molare Masse von 144 g/mol, woraus sich für einen Wirkstoffspiegel von 14 µg/ml eine Konzentration von 0,1 Nanomol ergibt. Das bedeutet, dass der therapeutische Zielbereich des Wirkstoffspiegels für freies Valproat im Patientenserum allenfalls gerade ein Millionstel der Konzentration beträgt, in denen VPA für meine und alle übrigen erwähnten Experimente verwendet wurde. Relativierend muss zwar erwähnt werden, dass die Substanz sehr hydrophil ist, weswegen *in vivo* erhebliche Konzentrationsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Geweben und insbesondere eine Anreicherung in der Leber und im Gehirn zu beobachten sind (Shen et al., 1999), allerdings bewegen sich diese Unterschiede im Bereich nur etwa einer Zehnerpotenz (Wieser, 1994). Somit scheint allein aufgrund der gewaltigen Dimension der Konzentrationsunterschiede zwischen



dem Einsatz von VPA im Patienten und im experimentellen Kontext nur schwierig vorstellbar, dass Valproat als Therapeutikum für die SMA in Frage kommen kann; ganz unabhängig davon, ob möglicherweise in Zukunft noch experimentell Effekte auf Motoneurone nachgewiesen werden könnten. *In vivo* wäre es vermutlich nicht möglich, die für eine Anhebung der SMN-Proteinmenge erforderliche VPA-Konzentration herzustellen, ohne den Patienten hierbei schwer zu schädigen.

Unabhängig von dieser Problematik ist es bislang ohnehin nicht gelungen, die erhoffte Wirkung von VPA auf Smn-defiziente Motoneurone – Erhöhung bzw. möglichst Normalisierung der SMN-Proteinmenge durch Überexpression des *SMN2*-Gens infolge HDAC-Inhibition – hinreichend zu belegen, so dass auch aus diesem Grund unklar bleibt, ob der Ansatz mit VPA zur Therapie der SMA überhaupt erfolgversprechend ist. Nichts desto trotz können HDAC-Inhibitoren grundsätzlich eine Erhöhung der SMN-Proteinmenge bewirken. Hier muss insbesondere SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid) erwähnt werden, durch dessen Verwendung bei SMA-Mäusen eine erhöhte Lebenserwartung, verbesserte motorische Funktionen, verminderte spinale Motoneurondegeneration und vergrößerte neuromuskuläre Endplatten beobachtet werden konnten (Riessland et al., 2010). Darüber hinaus wurde *in vivo* eine fast vollständige Wiederherstellung der neuromuskulären Funktionen bei Smn-defizienten Mäusen in den ersten zehn Lebenstagen beobachtet (Somers et al., 2013). Interessanterweise waren bei diesen Mäusen auch Defekte der Blut- und Gefäßversorgung der Skelettmuskulatur beobachtet worden, welche sich unter Behandlung mit SAHA ebenfalls normalisierten (Somers et al., 2013). Unklar ist jedoch, ob diese Effekte unmittelbar als Folge des Mangels an SMN-Protein oder sekundär als Folge der Denervierung und der daraus resultierenden verminderten Aktivität des Skelettmuskels auftreten. Immerhin ist aber durch Untersuchungen, bei denen bei SMA-Mäusen gewebespezifisch eine Überexpression des SMN-Proteins induziert wurde, auch eine unmittelbare Bedeutung des SMN-Proteins für Wachstum und Integrität von Skelettmuskulatur beobachtet worden (Martinez et al., 2012), wobei die genauen Mechanismen hier ebenfalls noch nicht bekannt sind.

Auch auf die pathologisch erniedrigte Akkumulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle in den Wachstumskegeln Smn-defizienter Motoneurone zeigte VPA keinen Effekt. Auf den ersten Blick stellt dies keine Überraschung dar, da aufgrund der Pathophysiologie der SMA ohne normale Smn-Proteinmengen Effekte auf Strukturen wie Wachstumskegel oder Präsynapse nicht unbedingt zu erwarten waren. Jedoch zeigen die Ergebnisse mit R-Roscovitine, dass eine phänotypische Normalisierung Smn-defizienter Motoneurone auch unabhängig von der Smn-Proteinmenge möglich ist. Daher muss noch genauer auf die Unterschiede zwischen R-Roscovitine und VPA hinsichtlich der Wirkung auf Kalziumkanäle eingegangen werden, um die mit den beiden Substanzen erzielten differierenden Ergebnisse einordnen zu können.

R-Roscovitine erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit von N-Typ Kalziumkanälen, was eine plausible Erklärung der beobachteten Effekte auf Smn-defiziente Motoneurone liefert. VPA interagiert ebenfalls mit Ionenkanälen, allerdings werden diese blockiert. Kanalblockaden durch VPA wurden für Natrium- und Kaliumkanäle (Van Dongen et al., 1986; Van den Berg et al., 1993) sowie für spannungsgesteuerte Kalziumkanäle des T-Typs und des P/Q-Typs beschrieben (Kelly et al., 1990; Tokuda et al., 2007). Die Blockade von Ionenkanälen spielt offenbar auch eine unterstützende Rolle für die antikonvulsive Wirkung von VPA, die hauptsächlich aber auf eine vermehrte Aktivität des inhibitorischen Neurotransmitters GABA zurückgeht (Loscher, 1999; Phiel et al., 2001). Für den Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX) sowie für den Inhibitor von N-Typ Kalziumkanälen  $\omega$ -Conotoxin (CTX) wurde eine Herabsetzung der spontanen neuronalen Aktivität bei isolierten embryonalen Motoneuronen in Zellkultur beschrieben (Jablonka et al., 2007). Diese Wirkung von CTX wird auf eine durch die Kanalblockade verursachte Inhibition des intraaxonalen Anstiegs von freiem Kalzium nach Aktionspotentialen zurückgeführt. Durch die Wirkung von CTX führen viele Aktionspotentiale nicht zu ausreichenden Anstiegen von freiem Kalzium nach Depolarisation der gesamten Zelle. Die spontane Erregbarkeit von spannungsabhängigen Kalziumkanälen bei kultivierten Motoneuronen wird durch 100  $\mu$ M VPA ebenso herabgesetzt (Rak et al., 2009). Bei Behandlung Smn-defizienter Motoneurone mit R-Roscovitine wurde hingegen eine Erhöhung der Frequenz lokaler Kalziumeinströme gemessen (unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine Blockade spannungs-

abhängiger Kalziumkanäle zu keiner Verbesserung der beobachteten Defekte von Differenzierung und Funktionalität präsynaptischer Strukturen in Smn-defizienten Motoneurone führt. Unter dem Gesichtspunkt, dass R-Roscovitine durch Öffnung dieser Kanäle eine phänotypische Normalisierung der Motoneurone bewirken kann, unterstreichen diese Ergebnisse andererseits die Relevanz lokaler Kalziumeinströme für die Pathogenese der SMA.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass die beobachtete Normalisierung des axonalen Wachstumsverhaltens kultivierter Smn-defizienter Motoneurone unter Applikation von R-Roscovitine in erster Linie als Folge der direkten Interaktion von R-Roscovitine mit spannungsabhängigen Kalziumkanälen auftritt. Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit der  $Ca_v2.2$  Kanäle bewirkt sekundär eine Normalisierung des Wachstumsverhaltens der Motoneurone, wobei die genauen Mechanismen, über die die normalisierten Kalziumeinströme zu einer Normalisierung der Mikroarchitektur der Wachstumskegel und des axonalen Wachstums führen, noch unklar sind. Störungen des Kalziumhaushalts sind bei Motoneuronen und auch Gliazellen aus Mausmodellen für die SMA vielfach beschrieben worden (Jablonka et al., 2007; Biondi et al., 2008; Biondi et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Subramanian et al., 2012; Lyon et al., 2014; McGivern et al., 2013; Riessland et al., 2017) und scheinen auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der ALS von Bedeutung zu sein (Saxena et al., 2013). Smn-defiziente Motoneurone behalten aber offenbar ihre Fähigkeit zur Differenzierung und können sich nach einer pharmakologisch induzierten Normalisierung der Kalziumeinströme im Bereich der Wachstumskegel annähernd normal entwickeln. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit von Kalziumsignalen für die präsynaptische Differenzierung und das Überleben von Motoneuronen und rücken die Stimulation spannungsabhängiger Kalziumkanäle als potentiell Ziel therapeutischer Substanzen in den Fokus; nicht nur für die SMA, sondern auch für andere neurodegenerative Erkrankungen.

Es wurden bereits Studien an SMA-Patienten durchgeführt, die einen genetisch orientierten Therapieansatz zur Hochregulation der SMN-Expression verfolgten (Antisense Oligonukleotide, ASO). Die ASOs bewirken eine Wiederherstellung des gestörten Spleißens des Exon 7 innerhalb des *SMN2*-Gens und regulieren somit indirekt die Menge an SMN-Protein hoch (Hua et al., 2011; Porensky et al., 2012).

Diese Studien wurden inzwischen erfolgreich abgeschlossen und die Wirksamkeit des unter dem Namen Spinraza® zugelassenen Medikaments als Therapeutikum für die SMA vom Typ 1 konnte eindrucksvoll belegt werden (Finkel et al., 2016; Finkel et al., 2017; Mercuri et al., 2018). Der Einsatz von Valproat als Therapeutikum für die SMA bleibt in Zukunft fraglich, da auch klinische Studien keine positive Wirkung von VPA auf SMA-Patienten zeigen (Swoboda et al., 2009; Swoboda et al., 2010; Kissel et al., 2011; Krosschell et al., 2018). Hingegen ist ebenfalls noch offen, ob alle SMA-Patienten gleichermaßen auf die ASO-Therapie reagieren. Somit lässt sich annehmen, dass Substanzen, die eine verbesserte Neurotransmission bei SMA-Patienten bewirken, in Zukunft zumindest eine unterstützende Wirkung der ASO-Therapie zeigen könnten, wenn nicht gar einen zweiten, alternativen Therapieansatz darstellen.

## **5. Zusammenfassung**

Die spinale Muskelatrophie ist eine monogenetische Erkrankung, die bereits im Kindesalter aufgrund von Motoneurondegeneration zu Muskelatrophie führt und nicht selten einen tödlichen Verlauf nimmt. Ursache der Erkrankung ist ein Mangel an SMN-Protein. Der hierfür verantwortliche Verlust des *SMN1*-Gens kann durch das *SMN2*-Gen aufgrund eines gestörten Spleißprozesses am Exon 7 nicht kompensiert werden. Neben Aufgaben in der RNA-Prozessierung wird das SMN-Protein für den axonalen Transport von Ribonucleinpartikeln in Motoneuronen benötigt, was bei der SMA zu pathologischem Wachstum, Differenzierung und Funktion der Motoraxone führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden kultivierte Motoneurone aus einem Mausmodell für die SMA Typ I (Genotyp *Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*) mit zwei unterschiedlichen Substanzen behandelt und deren Wirkungen auf das präsynaptische Differenzierungsverhalten der Motoneurone verglichen: R-Roscovitine, ein Agonist/Modulator spannungsabhängiger N-Typ- und P/Q-Typ-Kalziumkanäle, welcher zudem eine CDK-inhibierende Wirkung besitzt, sowie Valproat, ein HDAC-Inhibitor, der eine stimulierende Wirkung auf die SMN-Transkription hat. Es zeigte sich, dass R-Roscovitine in der Lage ist, das pathologische Wachstums- und präsynaptische Differenzierungsverhalten der *Smn*-defizienten Motoneurone zu normalisieren, ohne hierbei Einfluss auf die erniedrigte Menge an *Smn*-Protein zu nehmen. Die Behandlung mit Valproat beeinflusst hingegen weder die Menge an *Smn*-Protein, noch die pathologische Differenzierung der Wachstumskegel *Smn*-defizienter Motoneurone. Erklären lassen sich diese Effekte in erster Linie durch den Agonismus an spannungsabhängigen Kalziumkanälen durch R-Roscovitine. Durch vermehrten Kalziumeinstrom kommt es zur Normalisierung von Struktur und Funktion der Wachstumskegel. Ein CDK-vermittelter Effekt scheint unwahrscheinlich. Obgleich die genauen Vorgänge noch nicht verstanden sind, zeigen diese Ergebnisse, dass sich *Smn*-defiziente Motoneurone normal entwickeln können, wenn die hierfür erforderlichen kalziumabhängigen präsynaptischen Differenzierungssignale korrekt ausgelöst werden. Bei weiterer Erforschung sind Therapeutika denkbar, die in Zukunft die überwiegend genetisch orientierten Therapieansätze zur Hochregulation der SMN-Expression bei SMA-Patienten über einen von der Genetik unabhängigen Wirkmechanismus unterstützen können.

## **6.1 Literaturverzeichnis**

- Ackermann B, Krober S, Torres-Benito L, Borgmann A, Peters M, Barkooie SM, Tejero R, Jakubik M, Schreml J, Milbradt J, Wunderlich TF, Riessland M, Tabares L, Wirth B (2013). Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Hum Mol Genet.* 1;22(7): 1328-1347.
- Amaral MD, Pozzo-Miller L (2007). TRPC3 Channels Are Necessary for Brain-Derived Neurotrophic Factor to Activate a Nonselective Cationic Current and to Induce Dendritic Spine Formation. *J Neurosci.* 9;27(19): 5179–5189.
- Anagnostou E, Miller SP, Guiot MC, Karpati G, Simard L, Dilenge ME, Shevell MI (2005). Type I spinal muscular atrophy can mimic sensory-motor axonal neuropathy. *J Child Neurol.* 20: 147-150.
- Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, Lombard Y, André P, Poindron P, Gies JP (2006). Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sciences* 79: 484-490.
- Arnold WD, Kassar D, Kissel JT (2015). Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. Review. *Muscle Nerve* 51(2): 157-167.
- Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schächtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray G, Meijer L (2005). Roscovitine Targets, Protein Kinases and Pyridoxal Kinase. *J Biol Chem.* 280: 31208-31219.
- Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M (1997). Expression of the *SMN* gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet.* 6: 1961-1971.
- Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, Bella VL, Pettmann B, Triller A (1999). Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neuroscience* 11: 293-304.
- Benfenati F, Valtorta F, Bähler M, Greengard P (1989). Synapsin I, a neuron-specific phosphoprotein interacting with small synaptic vesicles and F-actin. *Cell Biol Int Rep.* 13(12): 1007-1021.
- Bergeijk J, Haastert K, Grothe C, Claus P (2006). Valproic Acid Promotes Neurite Outgrowth in PC12 Cells independent from Regulation of the Survival of Motoneuron Protein. *Chemical Biology & Drug Design* 67: 244-247.
- Bezzarides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol.* (8): 709-720.

- Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008). Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci.* 23;28(4): 953-962.
- Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F (2010). In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 25;30(34): 11288-11299.
- Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH (2014). The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem.* 21(31): 3551-3575.
- Brahe C, Zappata S, Neri G, Servidei S, Ricci E, Tonali P (1995). Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *The Lancet* 346: 741.
- Brahe C, Clermont O, Zappata S, Tiziano F, Melki J, Neri G (1996). Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I. *Hum Mol Genet.* 5: 1971-1976.
- Braun AP, Schulman H (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol.* 57: 417-445.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003). Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 12: 2481-2489.
- Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B (2006). In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol.* 59: 970-975.
- Briese M., Esmaili B, Fraboulet S, Burt EC, Christodoulou S, Towers PR, Davies KE, Sattelle DB (2009). Deletion of *smn-1*, the *caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet.* 18: 97-104.
- Buerglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki, J (1996). Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 32: 479-482.
- Buerglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J (1997). The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet.* 60: 72-79.

- Bukanov NO, Smith LA, Klinger KW, Ledbetter SR, Ibraghimov-Beskrovnaya O (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 444: 949-952.
- Buraei Z, Angheliescu M, Elmslie KE (2005). Slowed N-Type Calcium Channel (Ca<sub>v</sub>2.2) Deactivation by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Roscovitine. *Biophysical J* 89: 1681-1691.
- Buraei Z, Schofield G, Elmslie KS (2007). Roscovitine differentially affects Ca<sub>v</sub>2 and K<sub>v</sub> channels by binding to the open state. *Neuropharmacology* 52: 883-894.
- Buraei Z, Elmslie KS (2008). The separation of antagonist from agonist effects of trisubstituted purines on Ca<sub>v</sub>2.2 (N-type) channels. *J Neurochemistry* 105: 1450-1461.
- Burghes AH (1997). When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet.* 61: 9-15.
- Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S (1998). The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 7: 1927-1933.
- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997). Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet.* 61: 40-50.
- Carter TA, Bönemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC (1997). A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet.* 6: 229-236.
- Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997). Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18: 29-42.
- Khan YB, Miguel- Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M (2003). Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet.* 12: 1367-1376.
- Cho S, Meriney SD (2006). The effects of presynaptic calcium channel modulation by roscovitine on transmitter release at the adult frog neuromuscular junction. *Eur J Neurosci.* 23: 3200-3208.
- Cifuentes- Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet.* 11: 1439-1447.



- Clermont O, Burlet P, Lefebvre S, Burglen L, Munnich A, Melki J (1995). SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *The Lancet* 346: 1712.
- Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 6: 1205-1214.
- Cuscó I, Barceló MJ, Rojas-García R, Illa I, Gamez J, Cervera C, Pou A, Izquierdo G, Baiget M, Tizzano EF (2006). SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings. *J Neurol.* 253: 21-25.
- De Camilli P, Jahn R (1990). Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Annu Rev Physiol.* 52: 625-645.
- DeStefino NR, Pilato AA, Dittrich M, Cherry SV, Cho S, Stiles JR, Meriney SD (2010). (R)-roscovitine prolongs the mean open time of unitary N-type calcium channel currents. *Neuroscience* 167: 838-849.
- Dey A, Tergaonkar V, Lane DP (2008). Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature Rev.* 7: 1031-1040.
- DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997). Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 7: 339-352.
- Dimitriadi M, Kye MJ, Kalloo G, Yersak JM, Sahin M, Hart AC (2013). The neuroprotective drug riluzole acts via small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$ -channels to ameliorate defects in spinal muscular atrophy models. *J Neurosci.* 33 (15): 6557-6562.
- Doktor TK, Hua Y, Andersen HS, Broner S, Liu YH, Wieckowska A, Dembic M, Bruun GH, Krainer AR, Andresen BS (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: 395-416.
- Dombert B, Balk S, Lüningschrör P, Moradi M, Sivadasan R, Saal-Bauernschubert L, Jablonka S (2017). BDNF/trkB Induction of Calcium Transients through  $\text{Ca}_v2.2$  Calcium Channels in Motoneurons Corresponds to F-actin Assembly and Growth Cone Formation on  $\beta 2$ -Chain Laminin (221). *Front Mol Neurosci.* 30;10: 346
- Dubowitz V (1999). Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatric Neurology* 3: 49.

- Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J (1999). The promoters of the survival motor neuron gene (*SMN*) and its copy (*SMNc*) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet.* 64: 1365-1370.
- Fallini C, Zhang H, Su Y, Silani V, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ (2011). The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J Neurosci.* 9;31(10): 3914-3925
- Fallini C, Rouanet JP, Donlin-Asp PG, Guo P, Zhang H, Singer RH, Rossoll W, Bassell GJ (2014). Dynamics of survival of motor neuron (SMN) protein interaction with the mRNA-binding protein IMP1 facilitates its trafficking into motor neuron axons. *Dev Neurobiol.* 74(3): 319-332
- Fan L, Simard LR (2002). Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet.* 11: 1605-1614.
- Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet* 17;388(10063): 3017-3026.
- Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizziano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzmann AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De Vivo DC, ENDEAR Study Group (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 2;377(18): 1723-1732.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997). The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90: 1023-1029.
- Fletcher EV, Simon CM, Pagiazitis JG, Chalif JI, Vukojicic A, Drobac E, Wang X, Mentis GZ (2017). Reduced sensory synaptic excitation impairs motor neuron function via Kv2.1 in spinal muscular atrophy. *Nature Neurosci.* 20 (7): 905-916.
- Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000). Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 9: 849-858.
- Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, Melki J (2002). The molecular bases of spinal muscular atrophy. Review. *Curr Opin Genet Dev.* 12(3): 294-298.
- Fryer HJ, Knox RJ, Strittmatter SM, Kalb RG (1999). Excitotoxic death of a subset of embryonic rat motor neurons in vitro. *J Neurochem.* 72: 500-513.

- Garcia EL, Lu Z, Meers MP, Praveen K, Matera AG (2013). Developmental arrest of *Drosophila* survival motor neuron (Smn) mutants accounts for differences in expression of minor intron-containing genes. *RNA* 19(11): 1510-6.
- Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N (1992). Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 9(3): 479-489.
- Giavazzi A, Setola V, Simonati A, Battaglia G (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: 267-277.
- Gilliam T, Brzustowicz L, Castilla L, Lehner T, Penchaszadeh G, Daniels R, Byth B, Knowles J, Hislop J, Shapira Y, Dubowitz V, Munsat T, Ott J, Davies K (1990). Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 345: 823-825.
- Gomez TM, Spitzer NC (2000): Regulation of Growth Cone Behavior by Calcium: New Dynamics to Earlier Perspectives. *J Neurobiol*. 44: 174-183.
- Gomez TM, Zheng JQ (2006): The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nature Rev Neurosci*. 7: 115-125.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969-6978.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259 (5096): 780-785.
- Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt- Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Hubner C (2001). Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet*. 29: 75-77.
- Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G (2004). The SMN complex. *Exp Cell Res*. 296: 51-56.
- Guendel I, Agbottah ET, Kehn- Hall K, Kashanchi F (2010). Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 by cdk inhibitors. *AIDS Res Ther*. 7: 7.

- Hahn CM, Kleinholz H, Koester MP, Grieser S, Thelen K, Pollerberg GE (2005). Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* 134: 449-465.
- Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoeneborn S, Schonling J, Zerres K, Wirth B (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: 1927-1933.
- Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, Haastert K, Trankle C, Siebzehnruhl FA, Riessland M, Holker I, Claus P, Romstock J, Buslei R, Wirth B, Blumcke I (2006). In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem.* 98: 193-202.
- Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T (2004). Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18: 747-755.
- Hannus S, Buhler D, Romano M, Seraphin B, Fischer U (2000). The Schizosaccharomyces pombe protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Hum Mol Genet.* 9: 663-674.
- Hao le T, Burghes AH, Beattie CE (2011). Generation and Characterization of a genetic zebrafish model of SMA carrying the human SMN2 gene. *Molecular neurodegeneration.* 6: 24.
- Hao le T, Duy PQ, Jontes JD, Wolman M, Granato M, Beattie CE (2013). Temporal requirement for SMN in motoneuron development. *Hum Mol Genet.* 22: 2612-2625.
- Hauke J, Riessland M, Lunke S, Eyupoglu IY, Blumcke I, El-Osta A, Wirth B, Hahnen E (2009). Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition. *Hum Mol Genet* 18: 304-317.
- Henley J, Poo M (2004). Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals. *Trends Cell Biol.* 14: 320-330.
- Hilfiker S, Greengard P, Augustine GJ (1999). Coupling calcium to SNARE-mediated synaptic vesicle fusion. *Nat Neurosci.* 2(2): 104-106.
- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000). Htra2- beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *PNAS* 97: 9618-9623.

- Hosaka M, Hammer RE, Südhof TC (1999). A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron* 24(2): 377-387.
- Hosseinibarkooie S, Peters M, Torres-Benito L, Rastetter RH, Hupperich K, Hoffmann A, Mendoza-Ferreira N, Kaczmarek A, Janzen E, Milbradt J, Lamkemeyer T, Rigo F, Bennett CF, Guschlbauer C, Büschges A, Hammerschmidt M, Riessland M, Kye MJ, Clemen CS, Wirth B (2016). The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *Am J Hum Genet.* 1;99(3): 647-665
- Hsieh-Li HM, Chang J-G, Jong Y-J, Wu M-H, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000). A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 24: 66.
- Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, Krainer AR (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 1;24(15): 1634-1644
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011). Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478:123-126.
- Iannaccone ST (1998). Spinal muscular atrophy. *Semin Neurol.* 18: 19-26.
- Imlach, WL, Beck ES, Choi BJ, Lotti F, Pellizzoni L, McCabe BD (2012). SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*. *Cell* 151: 427-439.
- Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (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: 341-346.
- Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, Sendtner M (2000). The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol.* 247: (Suppl. 1), I/37- I/42.
- Jablonka S, Sendtner M (2003). Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy. *Amyotroph. Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 4: 144-149.
- Jablonka S, Wiese S, Sendtner M (2004). Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol.* 58: 272-286.
- Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007). Defective Ca<sup>2+</sup> channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol.* 179: 139-149.
- Jablonka S, Sendtner M (2017). Review: Developmental regulation of SMN expression: pathophysiological implications and perspectives for therapy development in spinal muscular atrophy. *Gene Therapy* 1-8.

- Jia Y, Zhou J, Tai Y, Wang Y (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci.* (5): 559-567.
- Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 17: 2552-2569.
- Kelly KM, Gross RA, Macdonald RL (1990). Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neurosci Lett.* 116: 233-238.
- Kim SH, Ryan TA (2010). CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. *Neuron* 67(5): 797-809
- Kimura S, Uchiyama S, Takahashi HE, Shibuki K (1998). cAMP-dependent long-term potentiation of nitric oxide release from cerebellar parallel fibers in rats. *J Neurosci.* 18(21): 8551-8558.
- Kino T, Ichijo T, Amin ND, Kesavapany S, Wang Y, Kim N, Rao S, Player A, Zheng YL, Garabedian MJ, Kawasaki E, Pant HC, Chrousos GP (2007). Cyclin-Dependent Kinase 5 Differentially Regulates the Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor through Phosphorylation: Clinical Implications for the Nervous System Response to Glucocorticoids and Stress. *Mol Endocrinol.* 21: 1552-1568.
- Kino T, Jaffe H, Amin ND, Chakrabarti M, Zheng YL, Chrousos GP, Pant HC (2010). Cyclin-Dependent Kinase 5 Modulates the Transcriptional Activity of the Mineralocorticoid Receptor and Regulates Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Mol Endocrinol.* 24: 941-952.
- Kissel JT, Scott CB, Reyna SP, Crawford TO, Simard LR, Krossschell KJ, Acsadi G, Elsheik B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson S, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM, Swoboda KJ; Project Cure Spinal Muscular Atrophy Investigators' Network (2011). SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy. *PLoS One.* 6(7): e21296.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch- Marcé M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 29: 842-51.
- Krossschell KJ, Kissel JT, Townsend EL, Simeone SD, Zhang RZ, Reyna SP, Crawford TO, Schroth MK, Acsadi G, Kishnani PS, Von Kleist-Retzow JC, Hero B, D'Anjou G, Smith EC, Elsheikh B, Simard LR, Prior TW, Scott CB, Lasalle B, Sakonju A, Wirth B, Swoboda KJ; Project Cure SMA Investigator's Network (2018). Clinical trial of L-Carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy type I. *Muscle Nerve* 57(2): 193-199.

- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD (2005). SMN $\Delta$ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet.* 14: 845-857.
- Leenders AGM, Sheng ZH (2005). Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: Implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol Ther.* 105(1): 69-84.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155.
- Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 16: 265.
- Leitch AE, Riley NA, Sheldrake TA, Festa M, Fox S, Duffin R, Haslett C, Rossi AG (2010). The cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine down-regulates Mcl-1 to override pro-inflammatory signalling and drive neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol.* 40: 1127-1138.
- Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, Yuan XB (2005). Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434 (7035): 894-898.
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, Gage FH, Lee KF (2005). Neurotransmitter Acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46, 569-579.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* (3):175-190.
- Liu Q, Dreyfuss G (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J.* 15: 3555-3565.
- Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90: 1013-1021.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *PNAS* 96: 6307-6311.
- Lorson CL, Androphy EJ (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet.* 9: 259-265.

- Loscher W (1999). Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 58: 31-59.
- Lotti F, Imlach WL, Saieva L, Beck ES, Hao le T, Li DK, Jiao W, Mentis GZ, Beattie CE, McCabe BD, Pellizzoni L (2012). An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* 151: 440-454.
- Lunn MR, Wang CH (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet* 21;371(9630): 2120-33.
- Lyon AN, Pineda RH, Hao le T, Kudryashova E, Kudryashov DS, Beattie CE (2014). Calcium binding is essential for plastin 3 function in Smn-deficient motoneurons. *Hum Mol Genet.* 15;23(8): 1990-2004.
- Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, Chavaudra N, Jeanson L, Milliat F, Eschwege F, Bourhis J (2003). Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 63: 2513-2517.
- Maggiorella L, Aubel C, Haton C, Milliat F, Connault E, Opolon P, Deutsch E, Bourhis J (2009). Cooperative effect of roscovitine and irradiation targets angiogenesis and induces vascular destabilization in human breast carcinoma. *Cell Prolif.* 42: 38-48.
- Maiese K, Chong ZZ (2004). Review: Insights into oxidative stress and potential novel therapeutic targets for Alzheimer disease. *Restor Neurol Neurosci.* 22(2): 87-104.
- Malatesta M, Scassellati C, Meister G, Ploettner O, Buehler D, Sowa G, Martin TE, Keidel E, Fischer U, Fakan S (2004). Ultrastructural characterisation of a nuclear domain highly enriched in survival motor neuron (SMN) protein. *Exp Cell Res.* 292: 312-321.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 25;245 (4920): 862-866.
- Martinez TL, Kong L, Wang X, Osborne MA, Crowder ME, Van Meerbeke JP, Xu X, Davis C, Wooley J, Goldhamer DJ, Lutz CM, Rich MM, Sumner CJ (2012). Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *J Neuroscience* 32 (25): 8703-8715
- Mayford M, Wang J, Kandel ER, O'Dell TJ (1995). CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* 81(6):891-904.
- McConkey DJ (1996). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Scanning Microsc.* 10: 777-793.
- McConkey DJ, Orrenius S (1996). Signal Transduction Pathways in Apoptosis. *Stem Cells* 14: 619-631.



- McGivern JV, Patitucci TN, Nord JA, Barabas MA, Stucky CL, Ebert AD (2013). Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia* 61(9): 1418-1428.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol.* 162: 919-931.
- Menegon A, Bonanomi D, Albertinazzi C, Lotti F, Ferrari G, Kao HT, Benfenati F, Baldelli P, Valtorta F(2006). Protein kinase A-mediated synapsin I Phosphorylation is a central modulator of Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptic activity. *J Neuroscience* 26(45):11670 –11681.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* 243: 527-536.
- Meister G, Eggert C, Fischer U (2002). SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* 12: 472-478.
- Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A (1990). Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *The Lancet* 336: 271-273.
- Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, Iannaccone ST, Kirschner J, Kuntz NL, Saito K, Shieh PB, Tulinius M, Mazzone ES, Montes J, Bishop KM, Yang Q, Foster R, Gheuens S, Bennett CF, Farwell W, Schneider E, De Vivo DC, Finkel RS, CHERISH Study Group (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med.* 15;378(7): 625-635.
- Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE (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: 2133-2143.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Hum Mol Genet.* 8: 1177-1183.
- Monani UR, McPherson JD, Burghes AH (1999). Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta.* 1445: 330-336.

- Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*<sup>-/-</sup> mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 9: 333-339.
- Monani UR, Coovert DD, Burghes AH (2000). Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 9: 2451-2457.
- Monani UR, Pastore MT, Gavriliina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (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: 41-52.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell.* 9(2): 229-231.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108(5): 595-598.
- Moradi M, Sivadasan R, Saal L, Lüningschrör P, Dombert B, Rathod RJ, Dieterich DC, Blum R, Sendtner M (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.
- Munsat T, Davies K (1992). "International SMA consortium meeting" (26- 28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord.* 2: 423- 8.121
- Munsat T, Davies K (1996). Spinal muscular atrophy. 32nd ENMC international workshop Naarden, The Netherlands, 10-12 March 1995. *Neuromuscular Disorders* 6: 125.
- Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10: 816-825.
- Ning K, Drepper C, Valori CF, Ahsan M, Wyles M, Higginbottom A, Herrmann T, Shaw P, Azzouz M, Sendtner M (2010). PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons. *Hum Mol Genet.* 19: 3159-3168.
- Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 423: 990-995.

- Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *PNAS* 93: 11173-11178.
- Oprea GE, Krober S, McWhorter ML, Rossoll W, Muller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth W (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320: 524-527.
- Owen N, Doe CL, Mellor J, Davies KE (2000). Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum Mol Genet.* 9: 675-684.
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000). Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet.* 9: 47-56.
- Parkitna JR, Obara I, Wawrzczak- Bargiela A, Makuch W, Przewlocka B, Przewlocki R (2006). Effects of GSK3 $\beta$  and Cdk5 Kinase Inhibitors on Morphine-induced Analgesia and Tolerance in Rats. *J Pharmacol Exp Therap.* DOI:10.1124/jpet.106.107581.
- Parsons DW, McAndrew PE, Iannaccone ST, Mendell JR, Burghes AH, Prior TW (1998). Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet.* 63: 1712-1723.
- Paushkin S, Charroux B, Abel L, Perkinson RA, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2000). The survival motor neuron protein of *Schizosaccharomyces pombe*. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J Biol Chem.* 275: 23841-23846.
- Pearn JH (1973). The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England. *J Med Genet.* 10: 260-265.
- Pearn JH, Hudgson P, Walton JN (1978). A clinical and genetic study of spinal muscular atrophy of adult onset: the autosomal recessive form as a discrete disease entity. *Brain* 101: 591-606.
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998). A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95: 615-624.
- Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002). Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 298: 1775-1779.

- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001). Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem.* 276: 36734-36741.
- Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M, Flockerzi V (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J.* 15(22): 6166-6171.
- Porensky PN, Mitrpant C, McGovern VL, Bevan AK, Foust KD, Kaspar BK, Wilton SD, Burghes AH (2012). A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet.* 1;21(7): 1625-1638.
- Prior TW, Swoboda KJ, Scott D, Hejmanowski AQ (2004). Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet.* 130: 307–310.
- Rak K, Lechner BD, Schneider C, Drexl H, Sendtner M, Jablonka S (2009). Valproic Acid blocks Excitability in SMA Type I Mouse Motoneurons. *Neurobiol Dis.* 36: 477-487.
- Rathod R, Havlicek S, Frank N, Blum R, Sendtner M (2012). Laminin induced local axonal translation of beta-actin mRNA is impaired in SMN-deficient motoneurons. *Histochem Cell Biol.* 138: 737–748.
- Riessland M, Ackermann B, Förster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B (2010). SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 19: 1492-1506.
- Riessland M, Kaczmarek A, Schneider S, Swoboda KJ, Löhr H, Bradler C, Grysko V, Dimitriadi M, Hosseinibarkooie S, Torres-Benito L, Peters M, Upadhyay A, Biglari N, Kröber S, Hölker I, Garbes L, Gilissen C, Hoischen A, Nürnberg G, Nürnberg P, Walter M, Rigo F, Bennett CF, Kye MJ, Hart AC, Hammerschmidt M, Kloppenburg P, Wirth B (2017). Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am J Hum Genet.* 2;100(2): 297-315.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001). SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum Genet.* 108: 255-266.
- Rodríguez-Santiago M, Mendoza-Torres M, Jiménez-Bremont JF, López-Revilla R (2007). Knockout of the *trcp3* gene causes a recessive neuromotor disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 7;360 (4): 874-879.

- Rogalinska M, Błonski JZ, Komina O, Goralski P, Zołnierczyk JD, Piekarski H, Robak T, Kilianska ZM, Wesierska-Gadek J (2010). R-Roscovotine (Seliciclib) Affects CLL Cells More Strongly Than Combinations of Fludarabine or Cladribine With Cyclophosphamide: Inhibition of CDK7 Sensitizes Leukemic Cells to Caspase-Dependent Apoptosis. *J Cell Biochem.* 109: 217-235.
- Rossi AG, Sawatzky DA, Walker A, Ward C, Sheldrake TA, Riley NA, Caldicott A, Martinez-Losa M, Walker TR, Duffin R, Gray M, Crescenzi E, Martin MC, Brady HJ, Savill JS, Dransfield I, Haslett C (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat Medicine* 12: 1056-1064.
- Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002). Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet.* 11: 93-105.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol.* 163:801-812.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003). A new role for Smn in axonal transport of  $\beta$ -actin mRNA and axon growth. 33. *Annual Meeting Society Neurosc.*, New Orleans, USA, 08-12.Nov.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Levebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie A (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80, 167-178.
- Rudnik-Schoneborn S, Goebel HH, Schlote W, Molaian S, Omran H, Ketelsen U, Korinthenberg R, Wenzel D, Lauffer H, Kreiss-Nachtsheim M, Wirth B, Zerres K (2003). Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology* 60: 983-987.
- Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010). Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci.* 30: 849-857.
- Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ (2003). A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch Neurol* 60: 1601-1603.
- Saal L, Briese M, Kneitz S, Glinka M, Sendtner M (2014). Subcellular transcriptome alterations in a cell culture model of spinal muscular atrophy point to widespread defects in axonal growth and presynaptic differentiation. *RNA* 20: 1789-1802.

- Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996). Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16(4): 797-803.
- Sann SB, Xu L, Nishimune H, Sanes JR, Spitzer NC (2008). Neurite Outgrowth and *In Vivo* Sensory Innervation Mediated by a Ca<sub>v</sub>2.2–Laminin 2 Stop Signal. *J Neurosci.* 28: 2366-2374.
- Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, Gros-Louis F, Caroni P (2013). Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 2;80(1): 80-96.
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich, WF, Wirth B, Kunkel LM (1998). Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet.* 20: 83-86.
- Schmid A, DiDonato CJ (2007). Animal models of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 22: 1004–1012.
- Schmidt D, Schachter SC (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ* 348: g254.
- Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Man Chan Y, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng J-F, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM (2004). The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* 431: 268.
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *PNAS* 94: 9920.
- Shen DD, Levy RH, Eadie MJ, Vajda FJ (1999). Valproate. *Antiepileptic Drugs. Pharmacology and therapeutics.* Springer-Verlag Berlin/Heidelberg 359-373.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257(5067): 201-206.

- Simon CM, Jablonka S, Ruiz R, Tabares L, Sendtner M (2010). Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 19: 973-986.
- Sivadasan R, Hornburg D, Drepper C, Frank N, Jablonka S, Hansel A, Lojewski X, Sternecker J, Hermann A, Shaw PJ, Ince PG, Mann M, Meissner F, Sendtner M (2016). C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat Neurosci.* 19: 1610-1618.
- Skordis LA, Dunckley MG, Buerglen L, Campbell L, Talbot K, Patel S, Melki J, Davies KE, Dubowitz V, Muntoni F (2001). Characterization of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA. *Hum. Genet.* 108: 356-357.
- Smith DS, Greer PL, Tsai LH (2001). Cdk5 on the brain. *Cell Growth Differ* 12: 277-283.
- Somers E, Riessland M, Schreml J, Wirth B, Gillingwater TH, Parson SH (2013). Increasing SMN levels using the histone deacetylase inhibitor SAHA ameliorates defects in skeletal muscle microvasculature in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neurosci Lett.* 4 S 0304-3940.
- Stefani G, Onofri F, Valtorta F, Vaccaro P, Greengard P, Benfenati F (1997). Kinetic analysis of the phosphorylation-dependent interactions of synapsin I with rat brain synaptic vesicles. *J Physiol.* 504 (3): 501-515.
- Stevens CF, Sullivan JM (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 21(4): 885-893.
- Subramanian N, Wetzel A, Dombert B, Yadav P, Havlicek S, Jablonka S, Nassar MA, Blum R, Sendtner M (2012). Role of Na(v)1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Hum Mol Genet.* 15;21(16): 3655-3667.
- Südhof TC (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80: 675-690.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH (2003). Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol.* 54: 647-654.
- Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, Prior TW, LaSalle B, Sorenson SL, Wood J, Acsadi G, Crawford TO, Kissel JT, Krosschell KJ, D'Anjou G, Bromberg MB, Schroth MK, Chan GM, Elsheikh B, Simard LR (2009). Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One.* 4(5): e5268.

- Swoboda KJ, Scott CB, Crawford TO, Simard LR, Reyna SP, Krossschell KJ, Acsadi G, Elsheik B, Schroth MK, D'Anjou G, LaSalle B, Prior TW, Sorenson SL, Maczulski JA, Bromberg MB, Chan GM, Kissel JT; Project Cure Spinal Muscular Atrophy Investigators Network (2010). SMA CARNI-VAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 19;5(8):e12140.
- Talbot K, Rodrigues NR, Ignatius J, Muntoni F, Davies KE. Gene conversion at the SMN locus in autosomal recessive spinal muscular atrophy does not predict a mild phenotype. *Neuromuscul Disord*. 7(3): 198-201.
- Talbot K, Davies KE (2001). Spinal muscular atrophy. *Semin Neurol*. 21: 189-197.
- Tang F, Dent EW, Kalil K (2003). Spontaneous Calcium Transients in Developing Cortical Neurons Regulate Axon Outgrowth. *J Neurosci*. 23: 927-936.
- Tang F, Kalil K (2005): Netrin-1 Induces Axon Branching in Developing Cortical Neurons by Frequency-Dependent Calcium Signaling Pathways. *J Neurosci*. 25: 6702- 6715.
- Tejero R, Lopez-Manzaneda M, Arumugam S, Tabares L (2016). Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet*. 1;25(21): 4703-4716
- Tokuda S, Kuramoto T, Tanaka K, Kaneko S, Takeuchi IK, Sasa M, Serikawa T (2007). The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q- type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha1A subunit gene and exhibits absence seizures. *Brain Res*. 1133: 168-177.
- Tomizawa K, Sunada S, Lu YF, Oda Y, Kinuta M, Ohshima T, Saito T, Wei FY, Matsushita M, Li ST et al (2003). Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol*. 163: 813-824.
- Torri Tarelli F, Bossi M, Fesce R, Greengard P, Valtorta F (1992). Synapsin I partially dissociates from synaptic vesicles during exocytosis induced by electrical stimulation. *Neuron* 9 (6):1143-53.
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS Jr., Chae T, Harlow E (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin dependent kinase 5. *Nature* 371: 419-423.
- Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K (2013). Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 5(2): 221-234
- Vajda FJ (2000). Monitoring of antiepileptic drug therapy with serum level measurements. *Medical J Australia* 187: 581-582.



- Vajda FJ, Eadie MJ (2014). The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs. *Epileptic Disord.* 16: 395-408.
- Van den Berg RJ, Kok P, Voskuyl RA (1993). Valproate and sodium currents in cultured hippocampal neurons. *Exp Brain Res.* 93: 279-287.
- Van Dongen AM, VanErp MG, Voskuyl RA (1986). Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. *Epilepsia* 27: 177-182.
- Viollet L, Bertrand S, Bueno Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guenet JL, Munnich A, Melki J (1997). cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). *Genomics* 40: 185-188.
- Vitali T, Sossi V, Tiziano F, Zappata S, Giuli A, Paravatou- Petsotas M, Neri G, Brahe C (1999). Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for *SMN2* in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum Mol Genet.* 8: 2525-2532.
- Wang GX, Poo MM (2005). Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434 (7035): 898-904.
- Wang J, Dreyfuss G (2001). Characterization of functional domains of the SMN protein in vivo. *J Biol Chem.* 276: 45387-45393.
- Weihl CC, Connolly AM, Pestronk A (2006). Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy. *Neurology* 8;67(3): 500-501.
- Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cAMP. *Science* 265(5180): 1878-1882.
- Weinhofer EA, Zhao L, Cohan CS (1999): Calcium Influx Alters Actin Bundle Dynamics and Retrograde Flow in Helisoma Growth Cones. *J Neuroscience* 19: 7971-7982.
- Wiese S, Herrmann T, Drepper C, Jablonka S, Funk N, Klausmeyer A, Rogers ML, Rush R, Sendtner M (2010). Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *Nature Prot.* 5: 31-38.
- Wieser HG (1994). Comparison of valproate level in human plasma, cerebrospinal fluid and brain tissue following administration of various preparations of valproate and valpromide. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 83: 1111-1116.

- Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K (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: 1340-1356.
- Wirth B (2000). An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation* 15: 228-237.
- Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmueller H, Blick S, Baasner A, Heller R (2006). Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Human Genetics* 119: 422-428
- Wishart TM, Mutsaers CA, Riessland M, Reimer MM, Hunter G, Hannam ML, Eaton SL, Fuller HR, Roche SL, Somers E, Morse R, Young PJ, Lamont DJ, Hammerschmidt M, Joshi A, Hohenstein P, Morris GE, Parson SH, Skehel PA, Becker T, Robinson IM, Becker CG, Wirth B, Gillingwater TH (2014). Dysregulation of ubiquitin homeostasis and beta-catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 124: 1821-1834.
- Yamamoto H, Matsumoto K, Araki E, Miyamoto E (2003): New Aspects of Neurotransmitter Release and Exocytosis: Involvement of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Phosphorylation of Synapsin I in Insulin Exocytosis. *J Pharmacol Sci.* 93, 30-34.
- Yamashita M, Nishio H, Harada Y, Matsuo M, Yamamoto T (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. *J European Neurology* 52: 101.
- Yamazaki T, Chen S, Yu Y, Yan B, Haertlein TC, Carrasco MA, Tapia JC, Zhai B, Das R, Lalancette-Hebert M, Sharma A, Chandran S, Sullivan G, Nishimura AL, Shaw CE, Gygi SP, Shneider NA, Maniatis T, Reed R (2012). FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell Rep.* 25;2(4): 799-806
- Yan Z, Chi P, Bibb JA, Ryan TA, Greengard P (2002). Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *J Physiol.* 540(Pt 3): 761-770.
- Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV (2006). BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nature neuroscience.* 9: 1009-1018.
- Zenker W, Krammer E (1967). Studies on the fine structure and innervation of the internal eye muscles of chickens. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 83(2): 147-6

- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forkert R, Wirth B (1995). Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy. *The Lancet* 346: 1162.
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003). Active Transport of the Survival Motor Neuron Protein and the Role of Exon-7 in Cytoplasmic Localization. *J Neurosci.* 23: 6627-6637.
- Zhao DY, Gish G, Braunschweig U, Li Y, Ni Z, Schmitges FW, Zhong G, Liu K, Li W, Moffat J, Vedadi M, Min J, Pawson TJ, Blencowe BJ, Greenblatt JF (2016). SMN and symmetric arginine dimethylation of RNA polymerase II C-terminal domain control termination. *Nature* 529: 48-53.
- Zhivotovsky B, Gahm A, Ankarcrona M, Nicotera P, Orrenius S (1995). Multiple Proteases Are Involved In Thymocyte Apoptosis. *Exp Cell Res.* 221: 404-412.

## **6.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

### **6.2.1 Abbildungen**

|              |   |       |
|--------------|---|-------|
| Abb. 1:      | Darstellung der <i>SMN</i> -Region auf Chromosom 5q13   | 4     |
| Abb. 2:      | Translation von <i>SMN1</i> - und <i>SMN2</i> -Gen  | 5     |
| Abb. 3:      | <i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> („low copy“)-Maus und gesundes Geschwistertier                                    | 9     |
| Abb. 4:      | Das R-Roscovitine-Molekül   | 18    |
| Abb. 5 a-c:  | <i>Smn</i> -Signalintensität in Soma, Axon und Wachstumskegel mit und ohne Behandlung mit R-Roscovitine                   | 39 f. |
| Abb. 6 a+b:  | Beispielbilder für die Verteilung von <i>Smn</i> -Protein in Soma, Axon und Wachstumskegel unter R-Roscovitine-Behandlung | 40 f. |
| Abb. 7:      | N-Typ Kalziumkanal-Signalintensität in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne R-Roscovitine-Behandlung         | 43    |
| Abb. 8:      | Beispielbilder für Wachstumskegel mit immunzytochemischer Färbung gegen N-Typ Kalziumkanäle ( <i>Ca<sub>v</sub>2.2</i> )  | 44    |
| Abb. 9 a-c:  | <i>Smn</i> -Signalintensität in Soma, Axon und Wachstumskegel mit und ohne VPA-Behandlung                                 | 46 f. |
| Abb. 10 a+b: | Beispielbilder für die Verteilung von <i>Smn</i> -Protein in Soma, Axon und Wachstumskegel unter VPA-Behandlung           | 48    |
| Abb. 11:     | N-Typ Kalziumkanal-Signalintensität in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne VPA-Behandlung                   | 50    |
| Abb. 12:     | Beispielbilder für Wachstumskegel mit immunzytochemischer Färbung gegen N-Typ Kalziumkanäle ( <i>Ca<sub>v</sub>2.2</i> )  | 50    |
| Abb. 13:     | Signalintensität von $\beta$ -Aktin in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne R-Roscovitine-Behandlung         | 52    |
| Abb. 14:     | Beispielbilder für Wachstumskegel mit immunzytochemischer Färbung gegen $\beta$ -Aktin                                    | 53    |
| Abb. 15:     | Wachstumskegelfläche von Motoneuronen unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine                           | 56    |
| Abb. 16:     | Beispielbilder für die Wachstumskegel von Motoneuronen unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine          | 57    |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Abb. 17: | Axonlänge von Motoneuronen unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine                        | 59 |
| Abb. 18: | Beispielbilder für die Axonlänge von Motoneuronen unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine | 60 |
| Abb. 19: | Kalziumabhängige Prozesse der Neurotransmitterfreisetzung in der Präsynapse                                 | 68 |

### **6.2.2 Tabellen**

|             |   |       |
|-------------|---|-------|
| Tab. 1:     | Klassifikation der SMA (nach Munsat und Davies, 1996)   | 2     |
| Tab. 2 a-c: | Antikörper und Farbstoffe für die Immunzytochemie   | 27    |
| Tab. 3 a:   | Motoneuron-Überlebensraten mit 10, 20 und 50 $\mu\text{M}$ R-Roscovitine  | 36    |
| Tab. 3 b:   | Motoneuron-Überlebensraten mit 0,01; 0,05; 0,1 und 0,5 $\mu\text{M}$ R-Roscovitine                                | 37    |
| Tab. 4 a-c: | Smn-Signalintensität in Soma, Axon und Wachstumskegel mit und ohne Behandlung mit R-Roscovitine                   | 38 f. |
| Tab. 5:     | N-Typ Kalziumkanal-Signalintensität in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne R-Roscovitine-Behandlung | 43    |
| Tab. 6 a-c: | Smn-Signalintensität in Soma, Axon und Wachstumskegel mit und ohne VPA- Behandlung                                | 46 f. |
| Tab. 7:     | N-Typ Kalziumkanal-Signalintensität in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne VPA-Behandlung           | 49    |
| Tab. 8:     | Signalintensität von $\beta$ -Aktin in den Wachstumskegeln von Motoneuronen mit und ohne R-Roscovitine-Behandlung | 52    |
| Tab. 9:     | Wachstumskegelfläche von Motoneuronen unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine                   | 55    |
| Tab. 10:    | Axonlänge Smn-defizienter Motoneurone unter unterschiedlichen Konzentrationen von R-Roscovitine                   | 59    |

## **Danksagung**

Zum Gelingen meiner Experimente und letztlich erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner für die Überlassung des interessanten Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen finanziellen Mittel sowie nicht zuletzt für die Ermutigung und bereitwillige, große Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Kristen Rak danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Zudem danke ich Frau Prof. Dr. Nurcan Üçeyler für die Berichterstattung über mein Promotionskolloquium.

Frau Priv.-Doz. Dr. Sibylle Jablonka danke ich besonderes herzlich für ihre Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit. Sie hat mich geduldig und engagiert bei der Planung und Durchführung der Experimente beraten, hat mich in die komplexe Technik der Motoneuron-Zellkultur eingewiesen, hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen, gab mir wertvolle Ratschläge und hat mich immer wieder motiviert. Sie hat dadurch einen hohen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

Frau Christine Schneider und Frau Nicole Rachor danke ich für ihre Hilfe und Anleitung bei allen Tätigkeiten im Labor, ihre Unterstützung bei auftretenden Problemen, ihre geduldige Hilfe bei technischen Fragen und den stets freundlichen Umgang.

Auch allen anderen (ehemaligen) Kollegen aus dem Team des Instituts für Neurobiologie danke ich für ihre vielfältige Unterstützung, interessante Diskussionen, Anregungen und Ratschläge, insbesondere Frau Dr. Bettina Holtmann, Herrn Dr. Dirk Pühringer, Herrn Dr. Christian Simon und Frau Regine Sendtner.

Meinem Chef, Herrn Priv.-Doz. Dr. Mathias Borst danke ich – neben allem in mich gesetzte Vertrauen und den vielen Dingen, die ich ihm in meiner internistisch-kardiologischen Ausbildung verdanke – für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Freunden Leif Hommers, Johannes Beck und Franz Fischer danke ich für die immer neue Unterstützung in allen Lebenslagen und die Ermutigung, diese Arbeit zu vollenden.

Schließen möchte ich mit einem großen Dank an meine Familie: meine liebe Frau Johanna und unseren kleinen Jakob, meine Schwester Anna und natürlich meine Eltern, die mir bis heute in jeder erdenklichen Art zur Seite stehen und die mir meinen Lebensweg erst ermöglicht haben. Ihnen ist als Ausdruck meiner Dankbarkeit diese Arbeit gewidmet.