

# **Der Einfluss des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack auf die exzitotoxische Neuronenschädigung**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl.-Pharm. Rebekka Ehinger geb. Dieter  
aus Tübingen

Tübingen  
2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

03.08.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Robert Lukowski

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Glutamat und die glutamaterge Synapse .....	1
1.2 Glutamattransporter .....	3
1.3 Ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren .....	5
1.3.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) .....	6
1.3.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) .....	13
1.4 Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität .....	14
1.4.1 Ca <sup>2+</sup> -abhängige mitochondriale Schädigung .....	19
1.4.2 Die Rolle von freien Sauerstoffspezies während der Exzitotoxizität.....	19
1.4.3 Die Rolle von Stickstoffspezies während der Exzitotoxizität .....	20
1.4.4 Apoptotische Zelltodmechanismen und deren Gegenspieler .....	21
1.5 Kaliumkanäle der <i>Slc</i> -Genfamilie .....	26
1.5.1 Der Na <sup>+</sup> -aktivierte K <sup>+</sup> -Kanal Slack .....	28
1.5.2 Topologie und Expression von Slack.....	30
1.5.3 Einfluss von Slack auf physiologische/pathophysiologische Prozesse .....	33
1.5.4 Bisheriger Kenntnisstand bezüglich des Zusammenhangs von Slack und exzitotoxischer Schädigung.....	43
1.6 Cerebelläre Granularzellen (CGCs) .....	46
1.6.1 CGCs als Modell zur Untersuchung von Zelltodmechanismen <i>in vitro</i> .....	47
1.7 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit.....	49
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>51</b>
2.1 Allgemeine Materialien .....	51
2.1.1 Geräte.....	51
2.1.2 Software.....	52
2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	53
2.2 Versuchsspezifische Materialien, Substanzen, Lösungen und Zellkulturmedien .....	54
2.2.1 Genotypisierung .....	54
2.2.2 Histologische Untersuchungen von Gehirnschnitten und CGC-Kulturen .....	55
2.2.3 Stereotaktische intrastriatale Mikroinjektion von NMDA.....	58

2.2.4	Organentnahme und Zellkultur (Präparation der Cerebelli und Kultivierung primärer Granularzellen).....	59
2.2.5	Exzitotoxizitätsstudien .....	61
2.2.6	RNA-Analytik.....	63
2.2.7	Proteinanalytik.....	66
2.2.8	Ca <sup>2+</sup> -Messung .....	69
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>71</b>
3.1	Mauszucht.....	71
3.1.1	Tierhaltung .....	71
3.1.2	Tiermodell - Slack-Knockout-Mauslinie.....	71
3.1.3	Verpaarung der Versuchstiere.....	71
3.2	Genotypisierung .....	72
3.2.1	DNA-Isolierung.....	72
3.2.2	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion .....	73
3.2.3	Detektion der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese .....	74
3.3	Immunfärbung der Gehirnschnitte und CGC-Kulturen zum Nachweis des Slack-Kanals.....	75
3.3.1	Fixierung der Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten .....	75
3.3.2	Immunhistochemie zum Nachweis von Slack in Gehirnschnitten.....	76
3.3.3	Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Slack in Gehirnschnitten .....	77
3.3.4	Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der Neuronenpopulation der CGC-Kulturen.....	78
3.3.5	Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Slack in CGC-Kulturen.....	79
3.3.6	Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der zeitabhängigen neuronalen Schädigung während der NMDA-Exzitotoxizität .....	79
3.4	Stereotaktische Injektion von NMDA ins Striatum.....	80
3.4.1	Durchführung der striatalen Mikroinjektion .....	80
3.4.2	Histologische Quantifizierung des Läsionsareals.....	82
3.5	Zellkultur primärer cerebellärer Granularzellen.....	84
3.5.1	Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Poly-L-Lysin (PLL).....	84
3.5.2	Isolation primärer cerebellärer Granularzellen aus Mausgehirn .....	85
3.6	Exzitotoxizitätsstudien .....	87
3.6.1	Untersuchung des Einflusses von Slack auf die Exzitotoxizität.....	87
3.6.2	Bestimmung der LDH-Aktivität.....	91
3.7	RNA-Analytik.....	94
3.7.1	RNA-Extraktion .....	94
3.7.2	cDNA-Synthese.....	95

---

3.7.3	RNA-Analytik mittels qRT-PCR .....	96
3.8	Proteinbiochemische Methoden .....	98
3.8.1	Proteinextraktion .....	98
3.8.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford.....	99
3.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	100
3.8.4	Western Blot-Analyse.....	102
3.8.5	Proteindetektion .....	103
3.9	Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration .....	103
3.9.1	Aufbau der Calcium-Messapparatur.....	104
3.9.2	Durchführung der Calcium-Messungen .....	105
3.10	Statistik .....	107
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>108</b>
4.1	Einfluss von Slack auf die NMDA-induzierte exzitotoxische Schädigung <i>in vivo</i> ....	108
4.1.1	Expressionsanalyse von Slack-Kanälen im Striatum .....	108
4.1.2	Einfluss von Slack auf die Neuroprotektion im Rahmen NMDA-induzierter Exzitotoxizität <i>in vivo</i> .....	109
4.2	Etablierung und Charakterisierung der primären cerebellären Granularzellkultur ..	111
4.2.1	Nachweis des Anteils neuronaler Zellen in der primären CGC-Kultur.....	111
4.2.2	Expressionsanalyse von Slack im Cerebellum und CGC-Kulturen .....	113
4.3	Untersuchungen zum Einfluss des Slack-Kanals auf die Exzitotoxizität <i>in vitro</i> ....	115
4.3.1	Auswirkung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität auf das Zellüberleben	115
4.3.2	Beteiligung verschiedener iGluRs an der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität .....	117
4.3.3	Auswirkung der NMDA-Rezeptorstimulation auf das Zellüberleben.....	118
4.3.4	Zusammensetzung der ionotropen Glutamatrezeptoren in CGC-Kulturen ..	120
4.3.5	Einfluss des Slack-Kanals auf den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg infolge der NMDA- Rezeptorstimulation .....	121
4.3.6	Expressionsanalyse neuronal exprimierter Slo-Kaliumkanäle nach NMDA- Exzitotoxizität .....	126
4.3.7	Einfluss der Slack-Ablation auf die mRNA-Transkription pro- und anti- apoptotischer Faktoren.....	129
4.3.8	Slack-Ablation vermindert die mRNA-Transkription von Neurotrophin- Rezeptoren .....	133
4.3.9	Einfluss der BDNF-Präinkubation auf das Zellüberleben im Rahmen exzitotoxischer NMDA-Untersuchungen.....	136
4.3.10	Einfluss von Slack auf die BDNF-induzierten Signalwege Akt/ERK.....	138

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>143</b>
5.1	Diskussion der <i>in vivo</i> generierten Daten .....	145
5.1.1	Expression von Slack im Striatum .....	145
5.1.2	Intrastriatale NMDA-Injektion zur Untersuchung der Slack-Neuroprotektion <i>in vivo</i> .....	145
5.1.3	Limitationen der striatalen Injektion von NMDA .....	147
5.2	Diskussion der <i>in vitro</i> generierten Daten .....	147
5.2.1	Expression von Slack in cerebellären Granularzellen .....	147
5.2.2	Reinheit der CGC-Neuronenkulturen.....	148
5.2.3	Die LDH-Aktivitätsbestimmung zur Quantifizierung der exzitotoxischen Schädigung .....	149
5.2.4	Einfluss der verschiedenen iGluRs auf die Exzitotoxizität und Slack-Aktivierung .....	150
5.2.5	NMDA-induzierte Ca <sup>2+</sup> -Transienten in WT und Slack-KO CGCs.....	152
5.2.6	NMDA-abhängige mRNA-Expressionsanalyse und Aktivierung der TrkB-Signalwege in WT und Slack-KO CGCs .....	155
5.3	Potentielle Mechanismen der Slack-abhängigen Neuroprotektion.....	158
5.3.1	Hypothese für eine Slack-abhängige Regulation der Genexpression .....	158
5.3.2	Bekannte zellprotektive Mechanismen verschiedener K <sup>+</sup> -Kanäle .....	160
5.3.3	Potentielle neuroprotektive Mechanismen des Slack-Kanals.....	163
5.4	Limitationen der durchgeführten Experimente und Ausblick .....	165
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>168</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>207</b>
8.1	Experimente unter Verwendung von CGC-Kulturen .....	207
8.1.1	NMDA-abhängige mRNA-Transkription von TGF-β1 und seinem Rezeptor (TGF-β1 RII).....	207
8.1.2	NMDA-abhängige Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK.....	208
8.2	Experimente unter Verwendung von primären Hippocampus-neuronenkulturen ...	209
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>210</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über die Genfamilien der Transmembran-Glutamattransporter .....	4
Tabelle 3.1: Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion ....	73
Tabelle 3.2: PCR-Programm für die Genotypisierung .....	74
Tabelle 3.3: Verwendete Antikörper für die IHC-Färbung der Gehirnschnitte .....	77
Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper für die IF-Färbung der Gehirnschnitte .....	77
Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper für die IF-Färbung zur Charakterisierung der CGC-Kulturen.....	78
Tabelle 3.6: Verwendete Antikörper für den IHC-Nachweis von Slack in CGC-Kulturen .....	79
Tabelle 3.7: Verwendete Antikörper für die IF-basierte Verlaufsdarstellung der Exzitotoxizität .....	80
Tabelle 3.8: Volumina für die Beschichtung/Kultivierung in Abhängigkeit des Zellkulturgefäßes.....	85
Tabelle 3.9: Verwendete Zellkulturgefäße und Zelldichten in Abhängigkeit des Experiments .....	87
Tabelle 3.10: PCR-Programm für die cDNA-Synthese .....	96
Tabelle 3.11: qRT-PCR-Programm .....	98

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der Glutamat- und Glutaminstoffwechsel .....	2
Abbildung 1.2: Übersicht über die Glutamatrezeptorfamilien .....	5
Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über die exzitotoxischen Schädigungsmechanismen .....	18
Abbildung 1.4: Rezeptoraffinitäten der Neurotrophine .....	24
Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau einer $\alpha$ -Untereinheit des Slack-Kanals .....	31
Abbildung 3.1: Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR der Slack-Mauslinie	75
Abbildung 3.2: Versuchsdurchführung der stereotaktischen NMDA-Mikroinjektion.....	82
Abbildung 3.3: Herstellung der Serienschritte und Reihenfolge in der die Gehirnschnitte auf die Objektträger aufgezogen werden.....	83
Abbildung 3.4: Versuchsdurchführung der verschiedenen Exzitotoxizitätsstudien.....	88
Abbildung 3.5: Versuchsdurchführung der NMDA-Exzitotoxizität in Abhängigkeit der Co- Stimulation mit BDNF .....	90
Abbildung 3.6: Pipettierschemata zur Untersuchung der Exzitotoxizität .....	91
Abbildung 3.7: Prinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung .....	92
Abbildung 3.8: Versuchsdurchführung RNA-Extraktion .....	94
Abbildung 3.9: Versuchsdurchführung RNA-Extraktion .....	99
Abbildung 3.10: Aufbau der Calcium-Messapparatur .....	105
Abbildung 3.11: Versuchsdurchführung $Ca^{2+}$ -Messung während NMDA-Stimulation .....	106
Abbildung 3.12: Versuchsdurchführung $Ca^{2+}$ -Messung wiederholte NMDA-Stimulation.....	107
Abbildung 4.1: Expressionsanalyse von Slack im Striatum adulter WT und Slack-KO Mäuse .....	109
Abbildung 4.2: Einfluss von Slack auf die NMDA-induzierte Neuronenschädigung <i>in vivo</i> .	110
Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzfärbung primärer cerebellärer Granularzellkulturen.....	112
Abbildung 4.4: Expressionsanalyse von Slack im Cerebellum und CGC-Kulturen.....	114
Abbildung 4.5: Relative LDH-Freisetzung nach Inkubation mit Glutamat.....	116
Abbildung 4.6: Einfluss der iGluRs AMPA/NMDA auf die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität .....	117
Abbildung 4.7: Relative LDH-Freisetzung nach Inkubation mit NMDA.....	118
Abbildung 4.8: Zeitverlauf der NDMA-Rezeptor-abhängigen Exzitotoxizität in CGC-Kulturen .....	120
Abbildung 4.9: Expressionslevel der AMPA-/NMDA-Rezeptoruntereinheiten .....	121
Abbildung 4.10: Änderung der FL Ratio 340/380 in Abhängigkeit der NMDA-Stimulation ..	122
Abbildung 4.11: Bestimmung der FL Ratio 340/380 bei wiederholter NMDA-Stimulation ...	125
Abbildung 4.12: Expressionsanalyse der Slo-Kaliumkanäle unter Basalbedingungen und im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität.....	127



---

Abbildung 4.13: Expressionsanalyse verschiedener pro- und antiapoptotischer Gene.....	129
Abbildung 4.14: Expressionsverlauf pro-/antiapoptotischer Gene während NMDA- Exzitotoxizität .....	131
Abbildung 4.15: Änderung im Expressionsverhältnis von pro-/antiapoptotischen Genen ...	132
Abbildung 4.16: Expressionsanalyse verschiedener Neurotrophine und ihrer Rezeptoren.	134
Abbildung 4.17: Einfluss von BDNF auf das Zellüberleben nach NMDA-Exzitotoxizität.....	136
Abbildung 4.18: Relative Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK unter Basalbedingungen .....	139
Abbildung 4.19: Aktivierung von Akt im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität .....	140
Abbildung 4.20: Aktivierung von ERK im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität .....	141
Abbildung 4.21: Phosphorylierung von CREB im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität .....	142
Abbildung 5.1: Hypothese - Neuroprotektiver Einfluss des Slack-Kanals bei Exzitotoxizität	165
Abbildung 8.1: Expressionsanalyse von TGF- $\beta$ 1 und seinem Rezeptor TGF- $\beta$ 1 RII .....	207
Abbildung 8.2: Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK im Verlauf der NMDA- Exzitotoxizität .....	208
Abbildung 8.3: Expression von Slack in primären kultivierten Hippocampusneuronen .....	209

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_{nu}$	nukleoplasmatische Calcium-Ionenkonzentration
$[Cl^-]_i$	intrazelluläre Chlorid-Ionenkonzentration
$[H^+]_i$	intrazelluläre Wasserstoff-Ionenkonzentration
$[Na^+]_i$	intrazelluläre Natrium-Ionenkonzentration
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriale Membranpotential
$\Delta\Psi_n$	nukleäre Transmembranpotential
°C	Grad Celcius
$\alpha$ -Faser	dünn myeliniesierte Nervenfasern
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
AA	Arachidonsäure
ADAR	Adenosin-Deaminase, <i>engl.</i> Adenosine deaminase acting on RNA
ADNFLE	<i>engl.</i> Autosomal dominant nocturnal front lobe epilepsy
ADP	Adenosindiphosphat
ADH	Nachhyperpolarisation, <i>engl.</i> Afterhyperpolarization
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Proteinkinase B
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	$\alpha$ -Amino-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierendeR Faktor 1; <i>engl.</i> Apoptotic peptidase activating factor 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arc	<i>engl.</i> Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
AUC	Fläche unter der Kurve, <i>engl.</i> Area under the curve
Bad	<i>engl.</i> Bcl-2-antagonist of cell death
Bak	Protein der Bcl-2-Familie, <i>engl.</i> Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Protein der Bcl-2-Familie, <i>engl.</i> Bcl-2 associated protein X
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bcl-2	<i>engl.</i> B-cell lymphoma 2
Bcl-x <sub>L</sub>	Protein der Bcl-2-Familie, <i>engl.</i> B-cell lymphoma-extra large
XII	

BDNF	<i>engl.</i> Brain-derived neurotrophic factor
BK-Kanal	spannungs- und $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit, <i>engl.</i> big conductance $\text{K}^+$ channel
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, <i>engl.</i> Bovine serum albumin
ca.	circa
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium-Ion
CaMKIV	$\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV
cAMP	cyclische Adenosin-3',5'-monophosphat, <i>engl.</i> Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
$\text{Ca}_v2.2$	spannungsabhängige (N-Typ) Calciumkanal
C-Faser	nicht myelinisierte Nervenfasern
CGC	cerebelläre Granularzelle
CHO-Zellen	Zelllinie aus Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters <i>engl.</i> Chinese hamster ovary cells
CHRNA4	Gen-Name: nikotinische Acetylcholinrezeptoruntereinheit $\alpha 4$
$\text{Cl}^-$	Chlorid-Ion
$\text{cm}^2$	Quadratcentimeter
CNQX	6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion; Cyanquixalin
CNTF	<i>engl.</i> Ciliary neurotrophic factor
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
$\text{CO}_3^-$	Carbonat-Ion
Cre	<i>engl.</i> Cyclization recombination
CREB	<i>engl.</i> cAMP response element-binding protein
cRNA	kodierende RNA-Strang, <i>engl.</i> Coding RNA
Ct	<i>engl.</i> Cycle threshold
CTD	Carboxy-Terminus-Domäne
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat/Diethylpyrocarbonat
$\text{dH}_2\text{O}$	deionisiertes Wasser
DIV	Tage in Kultur, <i>engl.</i> Days <i>in vitro</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate

DRG	Spinalganglion, <i>engl.</i> Dorsal root ganglion
dsDNA	Doppelstrang-DNA, <i>engl.</i> Double-stranded DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonal
EAA	exzitatorische Aminosäure, <i>engl.</i> Excitatory amino acid
EAAC1	exzitatorische Aminosäure-Carrier 1, <i>engl.</i> Excitatory amino acid carrier 1 (auch: EAAT3)
EAAT	exzitatorische Aminosäuretransporter
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration/mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, <i>engl.</i> Ethylene diamine tetraacetic acid
EIMFS	<i>engl.</i> Epilepsy of infancy with migrating focal seizure
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EOEE	<i>engl.</i> Early onset epileptic encephalopathies
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potential, <i>engl.</i> Excitatory postsynaptic potential
ER	endoplasmatische Retikulum
ERK	<i>engl.</i> p42/p44 extracellular signal-regulated kinase
ES	embryonale Stammzellen
F	Vorwärtsprimer, <i>engl.</i> Forward primer
fAHP	schnelle Nachhyperpolarisation
FC	<i>engl.</i> Fold change
FGF	<i>engl.</i> Fibroblast growth factor
FL	Fluoreszenz
FM	<i>engl.</i> Full mutation
FMR1	Gen-Name: <i>engl.</i> Fragile X mental retardation 1
Fmr1 <sup>-/-</sup>	FMRP- <i>Knockout</i>
FMRP	<i>engl.</i> Fragile X mental retardation 1 protein
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxy-methylester
FXS	Fragile X Syndrom
G	Glycin (Gly)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDNF	<i>engl.</i> Glial cell line-derived neurotrophic factor

GFAP	saure Gliafaserprotein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter (auch: EAAT1)
GLT1	Glutamatttransporter (auch: EAAT2)
GluA/AMPA-R	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat-Rezeptor
GluK	Kainat-Rezeptor
GluN/NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
GluR	Glutamatrezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Grb2	<i>engl.</i> Growth factor receptor-bound protein 2
GS	gLUTAMINSYNTHEASE
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, <i>engl.</i> hour
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion, Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	<i>engl.</i> Hanks' balanced salt solution
HCN-Ströme	Hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanalstrom ( <i>I<sub>h</sub></i> ), <i>engl.</i> Funny current
hnRNP	<i>engl.</i> Heterogenous nuclear ribonucleoprotein
Hz	Hertz
i. p.	intraperitoneal
IASP	<i>engl.</i> International association for the study of pain
IB4	Isolectin IB4
iBK	intrazellulär lokalisierte BK-Kanal
IF	Immunfluoreszenz
IGF	<i>engl.</i> Insulin-like growth factor
iGluR	Ionotrope Glutamatrezeptor
IHC	Immunhistochemie
I <sub>KNa</sub>	Na <sup>+</sup> -aktivierte Kaliumkanalstrom
IL-1 $\beta$ bzw. IL-6	Interleukin 1 $\beta$ /Interleukin 6
IMM	innere Mitochondrienmembran
INM	innere nukleäre Membran, <i>engl.</i> Inner nuclear membrane
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INT	londonitrotetrazolium-Violett
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
IPSP	Inhibitorische postsynaptische Potential, <i>engl.</i> Inhibitory postsynaptic potential

K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-abhängige Kaliumkanal
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KCNQ2	Gen-Name: <i>engl.</i> Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 2
KCNT1	Gen-Name: <i>engl.</i> Potassium sodium-activated channel subfamily T member 1
KG	Körpergewicht
KIF3C	Kinesin Protein des Subtyp 3C
Kir-Kanal	einwärts gleichrichtende Kaliumkanal, <i>engl.</i> Inward rectifier
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
K <sub>Na</sub>	Na <sup>+</sup> -aktivierte Kaliumkanal
KO	<i>engl.</i> Knockout
l	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDH	Lactatdehydrogenase
LTD	Langzeitdepression, <i>engl.</i> Long-term depression
LGIC	Ligandengesteuerte Ionenkanäle
Li <sup>+</sup>	Lithium-Ion
LIVBP	Leucin-Isoleucin-Valin-Liganden-Bindeprotein
loxP	<i>engl.</i> Locus of X-over P1
LTP	Langzeitpotenzierung, <i>engl.</i> Long-term potentiation
M	Molar
mA	Milliampere
Map1	Familie der <i>engl.</i> Microtubule-associated proteins
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mBK	mitochondriale BK-Kanal
MCT	Monocarboxylat-Transporter
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mGluRI/II/III	Metabotroper Glutamatrezeptor der Gruppe I/II/III
min	Minute
MK-801	Dizocilpine
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
XVI	

mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMPSI	<i>engl.</i> Malignant migrating partial seizures in infancy
mNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxid-Synthase
MNTB	<i>engl.</i> Medial nucleus of the trapezoid body
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore
mRNA	Boten-RNA, <i>engl.</i> Messenger RNA
ms	Millisekunde
MS	Multiple Sklerose
Msk	<i>engl.</i> Mitogen- and stress-activated kinase 1/2
mV	Millivolt
n. b.	nicht bekannt
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
Na <sup>+</sup> -/K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-/Kalium-ATPase (Natrium-Kalium-Pumpe)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form
NADH-Dehydrogenase	NADH : Coenzym Q Oxidoreduktase
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>v</sub> 1.1	spannungsabhängige Natriumkanal, Typ I (SCN1A)
nBK	nukleäre BK-Kanal
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[ <i>f</i> ]chinoxalin-2,3-dion
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCX	Natrium/Calcium-Austauscher
NDS	Normaleserum
NES	Nucleus-Export-Signalsequenz
NF-κB	<i>engl.</i> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell
ng	Nanogramm
NGF	<i>engl.</i> Nerve growth factor
NGS	Normalziegenserum
NHE	Natrium-Wasserstoff-Austauscher
nl	Nanoliter
NLS	Nucleus-Lokalisation-Signalsequenz
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
NTD	Amino-Terminus-Domäne
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
ONM	äußere nukleäre Membran, <i>engl.</i> Outer nuclear membrane
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
ONOO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrosoperoxycarbonat-Ion
OP	Operation
OS	<i>engl.</i> Ohtahara syndrome
P	Postnatal
p75NTR	p75 Neurotrophinrezeptor, <i>engl.</i> p75 neurotrophin receptor
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>engl.</i> Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PDZ	<i>engl.</i> Postsynaptic density-95/disc large/zona occludens
PFA	Paraformaldehyd
Phactr1	<i>engl.</i> Phosphatase and actin regulator 1
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
P-loop	Bindungsmotiv in Proteinen, <i>engl.</i> phosphate-binding loop
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Picomol
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PP1	Proteinphosphatase 1
pS	Picosiemens
PSD-95 Protein	<i>engl.</i> Postsynaptic density 95 protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q	Glutamin (Gln)



qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR, <i>engl.</i> Real-time quantitative PCR
R	Arginin (Arg)
R	Rückwärtsprimer, <i>engl.</i> Reverse primer
Raf	<i>engl.</i> Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	<i>engl.</i> Rat sarcoma
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung, <i>engl.</i> Relative centrifugal force
RCK	<i>engl.</i> Regulator of conductance of K <sup>+</sup>
rER	raue endoplasmatische Retikulum
R <sub>max</sub>	maximale FL Ratio 340/380
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl.</i> Revolutions per minute
RSK	Ribosomale-S6-Kinase
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
S1	Schutzstufe 1
S1-/S2-Domäne	Subdomäne 1/2
sAHP	langsame Nachhyperpolarisation
SCN1A	Gen-Name: <i>engl.</i> Sodium voltage-gated channel alpha subunit1
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, <i>engl.</i> SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler, <i>engl.</i> Standard error of the mean
SGK	Serum-Glucokortikoid-regulierte-Kinase
SK-Kanal	<i>engl.</i> Small conductance calcium-activated potassium channel
Slack	<i>engl.</i> Sequence like a calcium-activated potassium channel
Slack <sup>-/-</sup> bzw. Slack-KO	Slack-Knockout
Slack <sup>+/+</sup>	Slack-Wildtyp
Slack <sup>L1/+</sup>	heterozygoter Slack-Knockout
Slick	<i>engl.</i> Sequence like a calcium-activated potassium channel
Sos	<i>engl.</i> Son of sevenless
SPF	spezifiziert Pathogen-frei
TBC1D24	Gen-Name: <i>engl.</i> TBC1 domain family member 24
TBE	Tris-Borat-EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$ 1	<i>engl.</i> Transforming growth factor- $\beta$ 1
TM bzw. TMD	Transmembrandomäne
TMEM16C (ANO3)	Anoctamin-3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>engl.</i> Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
Trk	Tyrosinkinase
tw.	Teilweise
U	Umdrehungen
UBC	Pale-Zellen, <i>engl.</i> Unipolar brush cells
UTR	<i>engl.</i> Untranslated region
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v. a.	vor allem
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
vGluT	Vesikuläre Glutamattransporter
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation; <i>engl.</i> World Health Organization
WT	Wildtyp
xCT	Cystein-Glutamat-Antiporter
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Zn <sup>2+</sup>	Zink-Ion
ZNS	Zentrale NervensystemEinleitung

# 1 Einleitung

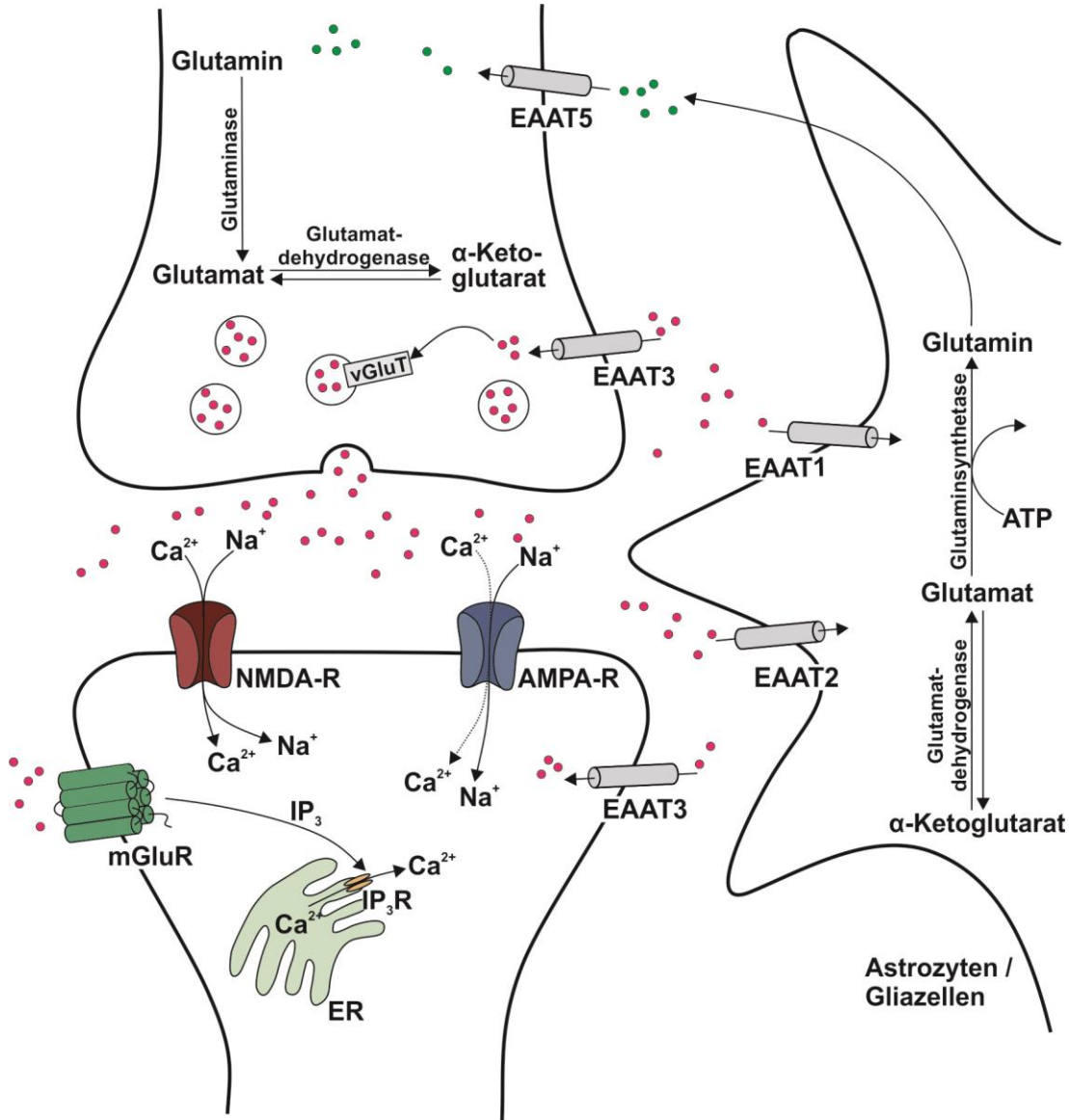
## 1.1 Glutamat und die glutamaterge Synapse

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Botenstoff des zentralen Nervensystems (ZNS) (Fonnum 1984) und ist sowohl als Aminosäurederivat als auch als Neurotransmitter an einer Vielzahl physiologischer Funktionen, wie beispielsweise der Gedächtnisbildung und der synaptischen Plastizität beteiligt (Meldrum 2000, Kauer und Malenka 2007, Schmid et al. 2008).

Stark erhöhte extrazelluläre Konzentrationen an Glutamat hingegen können zur exzitotoxischen neuronalen Schädigung führen (Choi et al. 1987, Choi 1994). Glutamatrezeptoren werden im Gehirn und den Spinalganglien von Neuronen sowie Gliazellen exprimiert (Hassel und Dingledine 2012). Da die Blut-Hirn-Schranke nahezu impermeabel für Glutamat ist, muss Glutamat im ZNS insbesondere in Gliazellen synthetisiert werden. In den Mitochondrien von v. a. Astrozyten aber auch Neuronen katalysiert die Glutamatdehydrogenase (GDH) die *de novo* Synthese von Glutamat durch die Transaminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat (Lieth et al. 2001, Rowley et al. 2012). Zudem kann Glutamat aus dem synaptischen Spalt von Gliazellen aufgenommen und dort „recycelt“ werden. Bei diesem Vorgang wird Glutamat von der Glutaminsynthetase (GS) zu Glutamin konvertiert. Letzteres kann über Glutamintransporter in den Extrazellularraum abgegeben und von Synapsen glutamaterger Neurone aufgenommen werden, wo es dann durch die Glutaminase hydrolysiert und als Glutamat in Vesikeln gespeichert wird (siehe Abbildung 1.1) (Meldrum 2000, Platt 2007). Die intrazelluläre Glutamatkonzentration in den synaptischen Vesikeln ist sehr hoch und beträgt ca. 100 mM (Meldrum 2000). Im Gegensatz dazu ist die extrazelluläre Glutamatkonzentration sehr gering und beträgt nur etwa 1 - 2  $\mu$ M (Anderson und Swanson 2000). Die Auslösung eines Aktionspotentials an der präsynaptischen Membran führt zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Dadurch kommt es zur  $Ca^{2+}$ -induzierten Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran und zur Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Dies bewirkt einen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration auf 0,1 - 1 mM. Das freigesetzte Glutamat kann anschließend entweder (I) an prä- und postsynaptische Rezeptoren binden, (II) über Glutamattransporter in das präsynaptische Neuron wiederaufgenommen und vesikulär gespeichert werden, (III) aus dem synaptischen Spalt abdiffundieren, oder wie bereits ausgeführt (IV) durch Glutamattransporter in Gliazellen aufgenommen werden (siehe Abbildung 1.1) (Anderson und Swanson 2000, Attwell 2000, Daikhin und Yudkoff 2000).

GABAerge Neurone sind die bedeutendsten Gegenspieler der glutamatergen Neurone. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des ZNS. Er wird in GABAergen Neuronen durch die Glutamatdecarboxylase (GAD) getriggerte Decarboxylierung von

Glutamat synthetisiert (Roberts und Frankel 1950, Purves et al. 2001, Rowley et al. 2012). Die Aktivierung GABAerge Neurone kann zur Beendigung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale beitragen (Schousboe und Waagepetersen 2007).



**Abbildung 1.1: Der Glutamat- und Glutaminstoffwechsel**

In Gliazellen und Neuronen katalysiert die Glutamatdehydrogenase die Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Zudem kann Glutamat aus dem synaptischen Spalt in Gliazellen aufgenommen und dort „recycelt“ werden. Dabei wird es durch die Glutaminsynthetase zu Glutamin konvertiert. Dieses wird durch Glutamintransporter in die Synapsen glutamaterger Neurone aufgenommen, dort in Glutamat umgewandelt und in Vesikeln gespeichert. Nach präsynaptischer Freisetzung kann Glutamat an postsynaptische Glutamatrezeptoren (iGluRs z. B. AMPA-/NMDA-Rezeptoren und mGluRs) binden. Dadurch kommt es zum Einstrom von  $Ca^{2+}$  und  $Na^+$  in die Zelle, bzw. zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Dieser Ionenanstieg wiederum triggert eine Reihe nachgeschalteter Signalkaskaden (nicht gezeigt). AMPA-R = AMPA-Rezeptor, NMDA-R = NMDA-Rezeptor, mGluR = metabotrope Glutamatrezeptor, EAAT1 - 3 und EAAT5 = exzitatorische Aminosäuretransporter 1 - 3 und 5, vGluT = vesikuläre Glutamattransporter, ER = endoplasmatisches Retikulum, IP<sub>3</sub>R = Inositoltriphosphat-Rezeptor)

## 1.2 Glutamattransporter

Glutamat wird im Gegensatz zu anderen Neurotransmittern nach Freisetzung in den synaptischen Spalt nicht enzymatisch abgebaut und kann auch nicht durch Diffusion in ausreichender Menge und mit ausreichender Geschwindigkeit abtransportiert werden. Daher besteht die einzige Möglichkeit zur Reduktion der extrazellulären Glutamatkonzentration in der Wiederaufnahme in Gliazellen und Neurone (Nicholls und Attwell 1990, Eliasof und Werblin 1993). Das dafür verantwortliche Glutamatwiederaufnahmesystem wird infolge hoher Glutamatkonzentrationen induziert, wodurch es schnell auf Konzentrationsänderungen reagieren und die Glutamatkonzentration effektiv reduzieren kann (Kanai und Hediger 1992, Duan et al. 1999, Ghosh et al. 2011, Vandenberg und Ryan 2013). Dies ist notwendig, um eine Sättigung der Glutamatrezeptoren, sowie die exzitotoxische Schädigung von Neuronen infolge exzessiver glutamaterger Transmission, zu verhindern. Anhand ihrer Spezifität sowie ihren kinetischen Eigenschaften können die Transportsysteme in zwei Klassen eingeteilt werden. So wird zwischen den (I) hochaffinen ( $K_m = 2 - 50 \mu\text{M}$ ) und (II) niedrigaffinen ( $K_m > 100 \mu\text{M}$ ) Glutamatwiederaufnahmesystemen unterschieden (Kanai et al. 1993). Die Aktivität hochaffiner Glutamattransporter (EAAT) hängt vom elektrochemischen Gradienten der  $\text{Na}^+$ -Ionen ab. Dahingegen ist die Aktivität anderer Transportsysteme, wie beispielsweise vesikulärer Glutamattransporter (vGluTs) oder Cystein-Glutamat-Antiporter (xCT),  $\text{Na}^+$ -unabhängig (Anderson und Swanson 2000). Die in der Plasmamembran lokalisierten Glutamattransporter (EAAT und xCT) können neben Glutamat auch Aspartat ins Zellinnere transportieren. Vesikulären Transporter hingegen besitzen andere pharmakologische und funktionelle Eigenschaften. Ihre Aktivität ist abhängig vom Protonengradienten und der Transport ist selektiv für Glutamat (Meldrum 2000). Bisher wurden fünf verschiedene hochaffine Glutamattransporter identifiziert: GLAST/EAAT1 (Storck et al. 1992), GLT1/EAAT2 (Pines et al. 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai und Hediger 1992), EAAT4 (Fairman et al. 1995) und EAAT5 (Arriza et al. 1997) (siehe Tabelle 1.1). Die erst später entdeckten humanen exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT1, EAAT2 und EAAT3 weisen eine hohe Homologie zu den bereits zuvor aus Rattenhirn klonierten Glutamat-Aspartat- (GLAST) und Glutamattransportern (GLT1), bzw. zu dem aus dem Gehirn des Kaninchens klonierten Exzitatorischen-Aminosäure-Carrier (EAAC1) auf (Pines et al. 1992, Arriza et al. 1994). Im Folgenden wird unabhängig von der Spezies ausschließlich die EAAT-Nomenklatur benutzt (Arriza et al. 1994). Hochaffine Natrium-Ionen ( $\text{Na}^+$ )-abhängige Transportproteine werden hauptsächlich von Gliazellen und Neuronen im ZNS exprimiert (Meldrum 2000, Vandenberg und Ryan 2013). Während die Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 vorzugsweise in Gliazellen vorkommen, werden die anderen drei Transporter EAAT3 - 5 v. a. neuronal exprimiert (Seal und Amara 1999). Die Triebkraft für den Transport von Glutamat wird durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Aktivität und den dadurch induzierten

transmembranären Gradienten von Na<sup>+</sup> und Kalium-Ionen (K<sup>+</sup>) bestimmt. So erfolgt der EAAT1 - 3 vermittelte Transport eines Glutamatmoleküls ins Zellinnere im Co-Transport mit 3 Na<sup>+</sup> und 1 Wasserstoff-Ion (H<sup>+</sup>), während im Antiport 1 K<sup>+</sup> die Zelle verlässt (Levy et al. 1998, Vandenberg und Ryan 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass neuronale Glutamattransporter an Chlorid-Ionen (Cl<sup>-</sup>)-Kanälen gekoppelt sind. Infolge der Bindung von Glutamat an diese Transporter kommt es zur raschen Aktivierung des Cl<sup>-</sup>-Stroms und zur Hyperpolarisation des Neurons. Dies beeinflusst die weitere Freisetzung von Glutamat im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus (Vandenberg und Ryan 2013). Die funktionelle Kopplung der Glutamattransporter an Cl<sup>-</sup>-Kanäle wurde v. a. in den Purkinjezellen des Cerebellums, welche überwiegend EAAT4 exprimieren, beobachtet (Kataoka et al. 1997). Interessanterweise zeigen die von Gliazellen exprimierte Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 unterschiedliche regionale Expressionsmuster. Während EAAT2 (GLT1) hauptsächlich im Hippocampus von Ratten nachgewiesen wurde, wird EAAT1 (GLAST) v. a. cerebellär exprimiert (Lehre und Danbolt 1998, Meldrum 2000). Der in der postsynaptischen Membran von Rattenneuronen hoch exprimierte Transporter EAAC (entspricht dem humanen EAAT3), welcher dort eine 15-fach höhere Expressionsdichte als AMPA-Rezeptoren aufweist, kann zur Beendigung exzitatorischer präsynaptischer Ströme beitragen (Meldrum 2000).

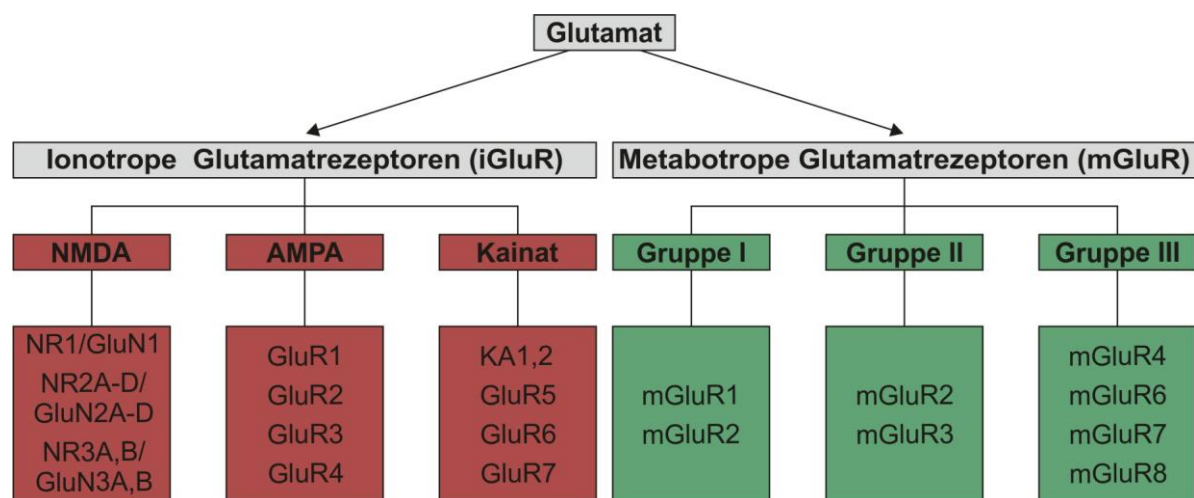
**Tabelle 1.1: Übersicht über die Genfamilien der Transmembran-Glutamattransporter**

	<b>EAAT1 (GLAST)</b>	<b>EAAT2 (GLT1)</b>	<b>EAAT3 (EAAC1)</b>	<b>EAAT4</b>	<b>EAAT5</b>
<b>ZNS Verteilung</b>	Weit verbreitet Cerebellum >> Hippocampus > Cortex > Striatum	Weit verbreitet Vorderhirn > Cerebellum	Weit verbreitet Hippocampus > Cortex und Striatum > Mittelhirn und Cerebellum	Cerebellum	Retina
<b>Zelltyp</b>	v. a. Glia, tw. Neurone	v. a. Glia	v. a. Neurone	Neurone (Cerebelläre Purkinjezellen)	Neurone (Müllerzellen Retina)
<b>K<sub>m</sub> für Glutamat</b>	77 µM	2-90 µM	12 µM	n. b.	n. b.

(Danbolt et al. 1990, Kanai und Hediger 1992, Pines et al. 1992, Storck et al. 1992, Arriza et al. 1994, Kirschner et al. 1994, Klockner et al. 1994, Zerangue et al. 1995, Velaz-Faircloth et al. 1996, Yamada et al. 1996, Arriza et al. 1997, Gegelashvili et al. 1997, Dehnes et al. 1998, Sims und Robinson 1999, Danbolt 2001).

### 1.3 Ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren

Durch die Stimulation präsynaptischer Neurone kommt es zur exozytotischen Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Die nachfolgende Bindung des Glutamats an seine postsynaptischen Rezeptoren führt zu deren Aktivierung und zur exzitatorischen synaptischen Transmission. Neben Axonen und Dendriten von Neuronen exprimieren auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia Glutamatrezeptoren (GluR) (Verkhatsky und Kirchhoff 2007, Hassel und Dingledine 2012). Glutamat kann außer an postsynaptische Rezeptoren auch an präsynaptische GluRs binden und dadurch seine eigene Freisetzung regulieren. Anhand des strukturellen Aufbaus der Rezeptoren und der Art der Erregungsübertragung unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen an GluRs, den ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren. Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluRs) fungieren als ligandengesteuerte nichtselektive Ionenkanäle. Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) hingegen regulieren über die Aktivierung von G-Proteinen beispielsweise die Freisetzung von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus intrazellulären Speichern. Abbildung 1.2 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Familien der Glutamatrezeptoren.



**Abbildung 1.2: Übersicht über die Glutamatrezeptorfamilien**

Glutamatrezeptoren können anhand ihres strukturellen Aufbaus sowie ihrer Signaltransduktionsmechanismen in ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren unterteilt werden. Zu den iGluRs zählen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Diese ligandengesteuerten Ionenkanäle setzen sich aus je vier verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten zusammen. Die Klasse der mGluRs kann in drei Subfamilien unterteilt werden mGluRI-III. Dabei handelt es sich bei den Vertretern der Gruppe I um  $G_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren, während die Rezeptoren der Gruppe II und III  $G_i$ -gekoppelt sind. Alle mGluR setzen sich aus je sieben Transmembrandomänen zusammen.

### 1.3.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR)

Die ionotropen Glutamatrezeptoren lassen sich anhand der präferenziellen Affinität selektiver Agonisten in drei Klassen einteilen: die N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-R; GluN) (Watkins 1962), die  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat-Rezeptoren (AMPA-R; GluA) (Krogsgaard-Larsen et al. 1980), sowie die Kainat-Rezeptoren (GluK) (Shinozaki und Konishi 1970, Dingledine und McBain 1999). Alle drei Rezeptorfamilien weisen eine hohe Affinität für Glutamat auf. Anfang der 1990er Jahren wurde, im Rahmen zahlreicher Klonierungsstudien, der strukturelle Aufbau dieser Rezeptoren genauer untersucht (Hollmann et al. 1989, Boulter et al. 1990, Hollmann und Heinemann 1994). Bis heute konnten 15 iGluR-Untereinheiten identifiziert werden, für die sechs verschiedene Genfamilien kodieren. So existieren neben den sieben NMDA-Rezeptoruntereinheiten GluN1 (NR1), GluN2A-D (NR2A-D), GluN3A und GluN3B (NR3A und NR3B), vier AMPA-Rezeptoruntereinheiten (GluR1-GluR4) und fünf Kainat-Rezeptoruntereinheiten (KA1, KA2, GluR5-GluR7) (siehe Abschnitt 1.2, Abbildung 1.2) (Traynelis et al. 2010).

AMPA- und Kainat-Rezeptoren können in Abhängigkeit der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten ausschließlich von monovalenten Ionen ( $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) oder zusätzlich auch von divalenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen passiert werden (Dingledine et al. 1999, Dingledine und McBain 1999, Traynelis et al. 2010). NMDA-Rezeptoren hingegen sind sowohl für mono- als auch divalenten Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) permeabel. Zudem bestimmt die Zusammensetzung der Untereinheiten die Bindungs- und Aktivierungseigenschaften der Rezeptoren (Dingledine et al. 1999, Cull-Candy et al. 2001, Paoletti et al. 2013). Allen iGluRs gemein ist ihre tetramere Struktur. So wird ein funktioneller Rezeptor durch die Zusammenlagerung von vier gleichen (homomere iGluRs) oder unterschiedlichen (heteromere iGluRs) Untereinheiten gebildet. Die verschiedenen Rezeptoruntereinheiten der iGluRs sind sehr homolog zueinander und bestehen aus ca. 900 Aminosäuren. Im Gegensatz zu den klassischen ligandengesteuerten Ionenkanälen (LGICs) besitzt jede dieser Untereinheiten nur drei  $\alpha$ -helicale Transmembrandomänen (TMD I, III und IV). Dies bedingt die jeweils extrazelluläre Lokalisation der ca. 400 Aminosäuren langen Amino-Terminus-Domäne (NTD) der Untereinheiten (Dingledine et al. 1999, Traynelis et al. 2010). Typischerweise enthält diese mehrere Glykosylierungsstellen und ist für die Oligomerisierung der Rezeptoren einiger iGluR-Unterfamilien verantwortlich (Hollmann und Heinemann 1994, Wo und Oswald 1994, Bennett und Dingledine 1995). Die Carboxy-Terminus-Domäne (CTD) ist intrazellulär lokalisiert und ermöglicht die untereinheitenspezifischen Interaktionen mit Proteinen, die z. B. den Transport und die Verankerung der Rezeptoren in der postsynaptischen Membran oder das synaptische Recycling regulieren (Braithwaite et al. 2000, Sheng und Lee 2001, Barry und Ziff 2002, Wenthold et al. 2003, Prybylowski und Wenthold 2004). Die ebenfalls extrazellulär lokalisierte Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) umfasst zwei getrennte



Subdomänen, die S1- bzw. S2-Domänen, welche Agonisten binden. Dabei befindet sich die ca. 150 Aminosäuren umfassende S1-Domäne direkt vor der TM I-Domäne und die ähnlich große S2-Domäne zwischen der TM III- und TM IV-Domäne (Stern-Bach et al. 1994). Diese beiden Segmente sind maßgeblich für die allosterische Agonistenbindung verantwortlich. Flexible Verbindungsstücke, die sogenannten *Linker* verbinden die S1-Domäne mit der TMD I und die S2-Domäne mit der TMD III bzw. TMD IV (Armstrong et al. 1998, Armstrong und Gouaux 2000, Madden 2002). Die zweiblättrige Struktur der ligandenfreien LBD ist vergleichbar mit einer geöffneten Muschel (Mano 1996), wobei jede der beiden Domänen eine Muschelhälfte symbolisiert. Die Vorstellung des Funktionsprinzips der Aktivierung sowie der Desensibilisierung der iGluRs beruht auf Kristallisationsstudien mit LBDs von AMPA-/NMDA-Rezeptoren (Armstrong et al. 1998, Furukawa und Gouaux 2003, Mayer 2006). Das *Gating*-Modell der Glutamaterezeptoren umfasst drei aufeinanderfolgende Schritte. Grundlegend für den Aktivierungsmechanismus ist zunächst die Dimerisierung zweier benachbarten LBDs über ihre S1-Subdomänen (Furukawa et al. 2005). Bei der Aktivierung von iGluRs kommt es initial zur Bindung des Agonisten in die Tasche der LBD. Dabei interagiert der Agonist zunächst mit dem S1-Segment. Anschließend kommt es zur Wechselwirkung zwischen dem Agonisten und einer spezifischen Aminosäuresequenz des S2-Segments, welches dadurch in der Richtung S1-Domäne gezogen wird. Infolge dieser Rotationsbewegung der S2-Domäne kommt es zum Schließen der muschelartigen Struktur der LBD, wodurch sich die S2-Domänen voneinander wegbewegen. Diese Konformationsänderung wird über die *Linker* an die TMDs weitergeleitet, was zur Öffnung des Kanals führt (Banke und Traynelis 2003, Mayer und Armstrong 2004, Vyklicky et al. 2014). Die andauernde Agonistenbindung bedingt eine weitere Konformationsänderung der Untereinheiten, die mit der Desensibilisierung des Rezeptors einhergeht. Dabei kommt es an der Grenzfläche der S1-Domänen der Rezeptordimere zur Abnahme der Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen. Dies führt zur Inaktivierung des Rezeptors trotz gebundenem Agonisten. Erst nach Dissoziation des Agonisten kann der Rezeptor in den Ruhezustand übergehen um dann erneut aktiviert werden zu können (Sun et al. 2002, Armstrong et al. 2006). Während NMDA-Rezeptoren nur langsam desensibilisieren, kommt es innerhalb weniger Millisekunden zur raschen Desensibilisierung von AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Experimentell kann diese Desensibilisierung durch Zugabe verschiedener Substanzen, wie z. B. Cyclothiazid oder Concavalin, welche die Interaktion zwischen den S1-Domänen verstärken, inhibiert werden. Die Porenregion der iGluR-Untereinheiten unterscheidet sich strukturell ebenfalls von der klassischer LGICs. Sie wird durch eine, die Membran nicht vollständig durchspannende Haarnadelschleife (TM II Domäne) gebildet, die von der intrazellulären Seite in die Membran hineinragt und eine signifikante Strukturähnlichkeit zum *P-loop* der K<sup>+</sup>-Kanäle aufweist (Bennett und Dingledine 1995). Auch

die Aminosäuresequenzen der TMD II und des Kaliumselektionsfilters der K<sup>+</sup>-Kanäle weisen eine große Homologie zueinander auf. Interessanterweise enthalten diese Sequenzen jeweils Aminosäurereste, die für die Ionenselektivität des Rezeptors bzw. Kanals entscheidend sind (Heginbotham et al. 1992, Panchenko et al. 2001, Madden 2002). Durch die simultane Stimulation mehrerer iGluRs kommt es zu einem massiven Einstrom an Kationen, was letztlich zur Aktionspotentialbildung in der Postsynapse führt. Dies stellt den schnellsten Weg der exzitatorischen synaptischen Transmission innerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems dar (Meldrum 2000).

## **NMDA-Rezeptoren**

Die NMDA-Rezeptoren spielen sowohl unter physiologischen (siehe 1.3.1, Physiologische Rolle der NMDA-Rezeptoren) als auch pathologischen Bedingungen (siehe 1.4) eine große Rolle. So ist der NMDA-Rezeptor Hauptmediator Glutamat-induzierter Exzitotoxizität (Choi et al. 1987, Dong et al. 2009). Die sieben bislang identifizierten Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren, die GluN1-GluN3s (siehe 1.3, Abbildung 1.2), werden jeweils von einem separaten Gen kodiert (Monyer et al. 1994). Zudem existieren acht verschiedenen Spleißvarianten der GluN1-Untereinheiten (Vyklícky et al. 2014). Durch die Existenz verschiedener Untereinheiten sowie Spleißvarianten ergibt sich eine große Vielfalt an möglichen Rezeptorkombinationen. Eine funktionelle tetramere Kanalpore wird durch Zusammenlagerung von mindestens einer obligaten GluN1-Untereinheiten sowie einer oder mehrerer GluN2- und/oder GluN3-Untereinheiten gebildet (Dingledine et al. 1999). Die Isoform der eingebauten GluN2-Untereinheiten bestimmt dabei maßgeblich die pharmakologischen, sowie physiologischen Eigenschaften des Rezeptors, wie beispielsweise die Affinität gegenüber Agonisten sowie porenverschließenden Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Wollmuth et al. 1998), die Permeationseigenschaften, die Einzelkanalleitfähigkeit und die Lokalisation (Dingledine und McBain 1999, Wollmuth und Sobolevsky 2004, Traynelis et al. 2010). In *in-situ*-Hybridisierungsstudien an Rattengehirnen wurde nachgewiesen, dass die Expression der verschiedenen NMDA-Rezeptorsubtypen einerseits von der Entwicklung des Gehirns und andererseits von der Gehirnregion abhängt (Watanabe et al. 1993, Monyer et al. 1994, Watanabe et al. 1994, Kohr 2006). GluN1-Transkripte sind bereits früh in der Embryonalentwicklung (E 14) nachweisbar und werden in adulten Nagergehirnen in nahezu allen Neuronen exprimiert. Im Lauf der Embryonalentwicklung werden neben den GluN1-Transkripten auch GluN2B- und GluN2D-Transkripte exprimiert. Die GluN2A- und GluN2C-Isoformen sind dagegen pränatal nicht detektierbar. Erst ab der Geburt nimmt die Expression dieser beiden Untereinheiten zu. Im Gegenzug nimmt die Abundanz der GluN2B- und GluN2D-Untereinheit im Laufe der postnatalen Gehirnentwicklung ab. Auch werden regionale Unterschiede in der Expression der GluN2-Rezeptorsubtypen innerhalb des ZNS

beobachtet. In *messenger* RNA (mRNA)-Expressionsstudien adulter Rattengehirne wurden GluN2A-Transkripte in nahezu allen Gehirnregionen, mit Ausnahme des Hypothalamus, nachgewiesen. GluN2B wird zwischen P 0 und P 12 hauptsächlich im Cortex und dem Hippocampus, sowie in kleinerer Menge auch im Striatum, dem Septum, den Thalamischen Kerngebieten und dem Cerebellum exprimiert. Im adulten Gehirn beschränkt sich die Expression dieser Untereinheit auf das Vorderhirn und den Hippocampus. Die GluN2D-Genexpression erreicht im frühen Embryonalstadium das Maximum und nimmt nach der ersten postnatalen Woche immer mehr ab. Im adulten Gehirn wird GluN2D nur noch begrenzt exprimiert. Lediglich im Thalamus und Hypothalamus, wo in frühen postnatalen Entwicklungsstadien hohe mRNA-Level detektiert werden, konnten noch Transkripte nachgewiesen werden. Die Expression der GluN2C-Untereinheiten beschränkt sich in erwachsenen Tieren hauptsächlich auf das Cerebellum (Monyer et al. 1994). Rezeptoren, die GluN3-Untereinheiten beinhalten, werden in geringerer Menge als GluN1- und GluN2-Rezeptoren exprimiert und sind bislang noch nicht so gut erforscht (Perez-Otano et al. 2016). Seit jedoch festgestellt wurde, dass die Expression dieser Untereinheiten einen Einfluss auf die Dichte der dendritischen Dornfortsätze (*Spines*) (Das et al. 1998, Roberts et al. 2009), die Synapsenreifung (Roberts et al. 2009), die Gedächtniskonsolidierung (Roberts et al. 2009), das Zellüberleben (Nakanishi et al. 2009) und die Entstehung verschiedener Neuropathologien (Perez-Otano et al. 2016) hat, erlangen diese zunehmend wissenschaftliches Interesse. Die GluN3A-Expression nimmt vor allem in den ersten beiden Lebenswochen stark zu, bevor sie anschließend wieder abnimmt. In erwachsenen Tieren können nur geringe Mengen an GluN3A-Transkripten nachgewiesen werden. Dieses entwicklungspezifische Expressionsprofil der GluN3A-Untereinheit wurde für viele Gehirnregionen und in verschiedenen Spezies beobachtet. Dies führt zur Annahme, dass GluN3A v. a. im Rahmen der pränatalen neuronalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt (Henson et al. 2010). Dahingegen können GluN3B-Transkripte erst ab der Geburt detektiert werden. Die Expression dieser Untereinheiten nimmt im Lauf der postnatalen Entwicklung immer mehr zu. Transkripte konnten im Neocortex, dem Hippocampus, im Striatum, dem Cerebellum, dem Hirnstamm und im Rückenmark nachgewiesen werden (Henson et al. 2010). Alle NMDA-Rezeptoruntereinheiten weisen eine große Homologie zueinander auf und ihre strukturelle Organisation entspricht der typischen Struktur der Glutamaterezeptoruntereinheiten (siehe 1.3.1). Die extrazellulären LBDs und NTDs der Untereinheiten sind für die Aktivierung und die Desensibilisierung der NMDA-Rezeptoren bzw. die Interaktion der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten untereinander wichtig (Ayalon und Stern-Bach 2001, Meddows et al. 2001). Eine Vielzahl endogener sowie synthetischer Liganden kann die Aktivität der NMDA-Rezeptoren beeinflussen. Dabei kommt es zur Interaktion der Liganden mit einem Bereich der NTD, welcher eine gewisse

Sequenzhomologie zum bakteriellen LIVBP (Leucin-Isoleucin-Valin-Liganden-Bindeprotein) aufweist (O'Hara et al. 1993, Paoletti et al. 2000, Herin und Aizenman 2004). Die Bindung allosterischer Modulatoren, wie beispielsweise Zink-Ionen ( $Zn^{2+}$ ) an die GluN2A- und GluN2B-Untereinheit führt zu einem verminderten *Gating* der NMDA-Rezeptoren (Paoletti et al. 2000, Rachline et al. 2005). Zudem unterscheiden sich NMDA-Rezeptoren in ihren Aktivierungseigenschaften stark von anderen LIGCs. So ist die Membranpore der Rezeptoren bei physiologischen Membranpotentialen ( $-90$  bis  $-65$  mV) durch spannungsabhängig gebundene Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ) verschlossen (Nowak et al. 1984). Daher ist für die Aktivierung konventioneller GluN1-/GluN2-Rezeptoren sowohl die Bindung endogener Agonisten an die LBD (Vyklícky et al. 2014) als auch die gleichzeitige Depolarisation der Membran notwendig (Mayer und Westbrook 1987, Ascher und Nowak 1988), weshalb die NMDA-Rezeptoren auch als Koinzidenzdetektoren bezeichnet werden (Seeburg et al. 1995). Die Depolarisation der Membran erfolgt durch die glutamaterge Aktivierung benachbarter ionotroper nicht-NMDA-Rezeptoren (v. a. AMPA-Rezeptoren) sowie der nachfolgenden Öffnung spannungsabhängiger  $Na^+$ -Kanäle (Bliss und Collingridge 1993). Die Agonisten der iGluRs werden in volle und partielle Agonisten unterteilt. Während Glycin eine hohe Affinität gegenüber GluN1- und GluN3-Untereinheiten aufweist (Yao und Mayer 2006), bindet Glutamat als voller Agonist an die GluN2-Untereinheit. Die Aktivierung von GluN1/GluN3 NMDA-Rezeptoren hingegen erfolgt durch Glycin alleine und wird weder durch die Anwesenheit von Glutamat noch durch  $Mg^{2+}$ -Ionen beeinflusst. Daher werden diese Rezeptoren auch als exzitatorische Glycinrezeptoren bezeichnet (Chatterton et al. 2002). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnten nur kleine, schnell desensibilisierende Ströme durch diese Kanäle gemessen werden. Zudem zeigen sie nur eine geringe Leitfähigkeit für  $Ca^{2+}$ -Ionen. Rezeptoren, die neben den beiden GluN1-Untereinheiten je eine GluN2- und GluN3-Untereinheit enthalten, zeigen eine ebenfalls verminderte Einzelkanalleitfähigkeit, sowie eine reduzierte  $Ca^{2+}$ -Permeabilität und  $Mg^{2+}$ -Sensitivität (Madry et al. 2007).

### ***Physiologische Rolle der NMDA-Rezeptoren***

Die Aktivierung der iGluRs durch Neurotransmitter ist direkt an den Erregungszustand einer Zelle gekoppelt. So dient die physiologische Aktivierung dieser Rezeptoren der Aufrechterhaltung der erregenden Signalübertragung zwischen den Neuronen. Der Strom durch die Kanalpore der NMDA-Rezeptoren wird hauptsächlich von  $Ca^{2+}$ -Ionen bestimmt, wodurch es zur nachfolgenden Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger *second messenger* Kaskaden in der postsynaptische Zelle und zur Weiterleitung des Signals in den Zellkern kommt. Dort findet dann die Transkription sowie die nachfolgende Translation diverser Gene und ihrer Proteinprodukte statt. Dabei erfolgt einerseits die Neusynthese von Proteinen, die für das

Überleben der Nervenzelle notwendig sind und andererseits die Synthese von Proteinen, die die Effizienz der synaptischen Signalübertragung beeinflussen. Dies führt zur Modifikation der Neurone sowie der synaptischen Verbindung der Nervenzellen untereinander und bedingt so die Ausbildung der synaptischen Plastizität, welche die Grundlage für die Gedächtnisbildung und Lernprozesse darstellt (Bliss und Collingridge 1993, Malenka und Nicoll 1999, Gillissen et al. 2002). Die Überaktivität von Glutamat ist Teil der pathologischen Mechanismen im Verlauf vieler ZNS-Erkrankungen, wie z. B. Schlaganfällen, Hirntraumata, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Huntington (Kemp und McKernan 2002, Vyklicky et al. 2014). Darüber hinaus wurde im Rahmen von Epilepsien und neuropathischen Schmerzen eine gesteigerte glutamaterge Signalübertragung beobachtet. Infolge der Überaktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren kommt es u. a. zum massiven Einstrom an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dies bedingt die Modulation nachgeschalteter Signalprozesse, wodurch es zu kurz- und langfristigen Veränderungen der Neurone kommt (siehe 1.4) (Hardingham und Bading 2003).

### **AMPA-Rezeptoren**

AMPA-Rezeptoren vermitteln den Hauptteil der schnellen exzitatorischen Neurotransmission im ZNS (Henley, 2013). Als tetramere Rezeptoren setzen sie sich aus den vier GluR1-GluR4-Untereinheiten zusammen, welche eine große Aminosäuresequenzhomologie (68 - 73 %) zueinander aufweisen. Die Struktur der AMPA-Rezeptoren, sowie die *Gating*-Mechanismen entsprechen denen der anderen iGluRs (siehe 1.3.1) (Henley und Wilkinson 2013). Meist werden heteromere Komplexe, wie GluR1/GluR2 bzw. GluR2/GluR3, ausgebildet, jedoch können sich auch vier identische Untereinheiten zu homotetrameren Rezeptorkomplexen zusammenlagern (Hollmann und Heinemann 1994, Wenthold et al. 1996, Dingledine et al. 1999). Zudem wird die Rezeptorvariabilität durch die Existenz verschiedener Spleißvarianten erhöht. So existieren von jeder AMPA-Untereinheit zwei Spleißvarianten, welche als Flip- bzw. Flop-Variante bezeichnet werden und sich in der Ab- bzw. Anwesenheit eines alternativ gespleißten Exons unterscheiden. Dieses Exon führt dazu, dass die Flop-Varianten der Untereinheiten je eine zusätzliche, der TMD IV vorangestellte, 38 Aminosäuren umfassende Sequenz enthalten (Sommer et al. 1990, Wright und Vissel 2012, Henley und Wilkinson 2013). Flip- und Flop-Varianten unterscheiden sich in ihren Desensitisierungseigenschaften, entsprechend desensitisieren Flip-Varianten langsamer und weniger stark als Flop-Varianten (Mosbacher et al. 1994, Partin et al. 1994, Partin et al. 1996). Zudem kommt es zur posttranskriptionellen RNA-Editierung der GluR2-Untereinheit. Dabei wird ein Adenosinrest der prä-mRNA, welcher sich im Porenregion-kodierenden Sequenzbereich befindet, durch das Enzym Adenosindeaminase (*adenosine deaminase acting on RNA* (ADAR)) zu Inosin deaminiert. Dies bedingt eine veränderte

Nukleotidsequenz der reifen mRNA sowie eine veränderte Basentriplettabfolge (CIG statt CAG). Dadurch kommt es an den Ribosomen zur Interaktion der mRNA mit Guanosyl- statt mit Adenosyl-tRNA, was nachfolgend die Translation von Arginin (R) statt Glutamin (Q) bewirkt (Seeburg 1996, Wright und Vissel 2012, Henley und Wilkinson 2013). Das Ausmaß der Editierung ist dabei abhängig von der Gehirnentwicklung und Spezies. So werden GluR2-Untereinheiten der Ratte zu 100 % editiert, während z. B. humane GluR2-Untereinheiten in der Substantia nigra nur zu 72 % editiert werden (Nutt und Kamboj 1994). Der Austausch von Glutamin gegen das geladene Arginin führt zu einer extrem verminderten  $Ca^{2+}$ -Permeabilität, sowie einer geringeren Einzelkanalleitfähigkeit und einer annähernd linearen Strom-Spannungsbeziehung der Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren, welche die R-Variante der GluR2-Untereinheit enthalten, sind nahezu undurchlässig für  $Ca^{2+}$ -Ionen (Jonas et al. 1994, Jonas und Burnashev 1995, Wright und Vissel 2012). Mehrere Publikationen zeigen, dass die R-Variante von GluR2 dominant in heteromeren Rezeptorkomplexen verbaut wird (Hume et al. 1991, Verdoorn et al. 1991, Swanson et al. 1997). Zudem weisen einige Studien darauf hin, dass die RNA-Editierung an der Q/R-Stelle einen entscheidenden Einfluss auf die Oberflächenexpression der Rezeptoren nimmt (Greger et al. 2002, Greger et al. 2003, Wright und Vissel 2012, Henley und Wilkinson 2013). Des Weiteren werden die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2, GluR3 und GluR4 an der R/G-Stelle editiert, die sich N-terminal zur Flip-/Flop-Aminosäuresequenz zwischen der TMD II und TMD III befindet. Dabei kommt es zum Austausch von Arginin durch Glycin, was zu einer verminderten Desensibilisierung und zu einer beschleunigten Reaktivierbarkeit der Rezeptoren führt (Lomeli et al. 1994, Wright und Vissel 2012). Je nach AMPA-Rezeptorzusammensetzung und der dadurch bedingten Durchlässigkeit der Rezeptoren für  $Ca^{2+}$ -Ionen sind diese an der synaptischen Plastizität, der Langzeitpotenzierung/-depression (LTP/LTD) sowie an exzitotoxischen Prozessen beteiligt. Interessanterweise werden AMPA-Rezeptoren nach ihrer Synthese in Transportvesikeln postsynaptischer Neurone gespeichert und zurückgehalten. Erst infolge synaptischer Aktivität vermitteln Transportproteine die aktivitätsabhängige Translokation der Rezeptoren und deren Einbau in die postsynaptische Membran von Neuronen des Hippocampus oder Cerebellums (Ehlers 2000, Gerges et al. 2004, Lee et al. 2004). Darüber hinaus zeigen Befunde von Peng et al., dass neben AMPA-Rezeptoren, denen die GluR2-Untereinheit fehlt, auch solche, die die uneditierte Form von GluR2 enthalten, einen Einfluss auf exzitotoxische Neuronendegeneration während Ischämie haben (Peng et al. 2006).

### 1.3.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR)

Neben den iGluRs existiert noch die erst später entdeckte Gruppe der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs). So konnten Sladeczek et al. in den 80-er Jahren erstmals zeigen, dass Glutamat zu einer Erhöhung des intrazellulären *second messengers* Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) führt (Sladeczek et al. 1985). Zwei Jahre später identifizierte Sugiyama et al. eine neue Rezeptorklasse und prägte den Begriff des metabotropen Glutamatrezeptors. Inzwischen wurden acht verschiedene Gene identifiziert, welche für die mGluR1 - 8 Rezeptoren kodieren. Zudem existiert eine Vielzahl an Spleißvarianten. Alle mGluRs besitzen sieben transmembranäre Domänen, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus (Nakanishi und Masu 1994). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die mGluRs keinerlei Sequenzhomologie zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren aufweisen (Hollmann und Heinemann 1994). Innerhalb des ZNS besitzen mGluRs eine Vielzahl an Funktionen, so mediiieren sie u.a. langsame exzitatorische Potentiale (EPSPs) (Glaum und Miller 1992, McCormick und von Krosigk 1992, Eaton et al. 1993, Nakanishi und Masu 1994) und inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) (Fiorillo und Williams 1998). Zudem sind sie an der Regulation von  $Ca^{2+}$ -,  $K^+$ - und nicht selektiven Ionenkanälen beteiligt und fördern bzw. hemmen die präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung. Daneben tragen sie zur Induktion von LTP und LTD, dem *in vitro* Korrelat der Gedächtnisbildung, sowie der Regulation des iGluR-Transports bei. Des Weiteren modifizieren mGluRs die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission sowie die neuronale Entwicklung. Andererseits sind sie an der Entstehung verschiedener neuronaler Erkrankungen wie Epilepsien, Angst, Fragiles X Syndrom, Hypoxie sowie exzitotoxischem Zelltod beteiligt (Ferraguti und Shigemoto 2006). Die mGluRs können anhand der Sequenzhomologien zueinander, ihren pharmakologischen Eigenschaften, sowie den unterschiedlichen nachgeschalteten Signaltransduktionswegen in drei Subfamilien eingeteilt werden (siehe Abschnitt 1.3, Abbildung 1.2) (Nakanishi und Masu 1994, Conn und Pin 1997, Alagarsamy et al. 1999, Schoepp et al. 1999). Während mGluRs einer Familie eine 70 %-ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz zeigen, besteht zwischen den Rezeptoren unterschiedlicher Subfamilien eine maximal 45 %-ige Sequenzhomologie. Die Gruppe I der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRIs) umfasst die beiden Subtypen mGluR1 und mGluR5 sowie zahlreiche verschiedene Spleißvarianten dieser beiden Rezeptorsubtypen. Sowohl mGluR1 als auch mGluR5 sind vorwiegend postsynaptisch lokalisiert (Pin und Duvoisin 1995, Schoepp 2001, Dong et al. 2009) und an  $G_q$  gekoppelten. Infolge der Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zur Stimulation der Phospholipase C (PLC), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) triggert. Die Spaltung von  $PIP_2$  führt zum Anstieg der  $IP_3$ - und Diacylglycerol (DAG)-Konzentration im Zellinneren. Dort bindet  $IP_3$  an  $IP_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER),

wodurch es zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER kommt. DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  führen nachfolgend zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Fukunaga et al. 1992, Iqbal Hasham et al. 1997). Dies wiederum führt zur Phosphorylierung zahlreicher Zielproteine inklusive der AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Bedingt durch diese Phosphorylierung können mGluRs Einfluss auf die neuronale Aktivität der Neurone nehmen. Zur Gruppe II der mGluRs (mGluRIIs) zählen die beiden Subtypen mGluR2 und mGluR3. In der Gruppe III (mGluRIIs) finden sich die mGluR4s, mGluR6s, mGluR7s und mGluR8s. Die Rezeptoren dieser beiden Gruppen sind an  $G_i$  gekoppelt und führen damit zu einer Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität. Dadurch kommt es zur Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration, was letztlich zu gesteigerten  $\text{K}^+$ - und verringerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen und der dadurch bedingten Hyperpolarisation der Zellmembran führt (Schoepp 2001). Metabotrope GluRII/III sind hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert und modulieren u. a. die Neurotransmitterfreisetzung (Conn und Pin 1997, Shigemoto et al. 1997, Cartmell und Schoepp 2000, Schoepp 2001). Im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen tragen mGluR1 und mGluR5 durch die Generierung langsamer EPSPs, sowie der dadurch bedingten Modulation von Ionenkanälen, zum Zelltod bei. Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse von Lee et al. auf einen protektiven Einfluss der mGluR2s auf das neuronale Zellüberleben im Rahmen der Morbus Alzheimer Erkrankung hin. So kommt es infolge der Aktivierung von mGluR2 u. a. zur Aktivierung des ERK-Signalwegs sowie zur gesteigerten Phosphorylierung des Tau-Proteins und zur Reduktion von oxidativem Stress (Lee et al. 2004, Lee et al. 2009). Die verschiedenen Rezeptorsubtypen unterscheiden sich jedoch nicht nur funktional, auch ihre regionale Expression im ZNS ist unterschiedlich. Im Gehirn erwachsener Ratten konnten mittels *in-situ*-Hybridisierung und immunohistochemischen Untersuchungen die verschiedenen Expressionsmuster der mGluR-Subtypen aufgezeigt werden. Im Folgenden wird allerdings nur auf die Expression der mGluRs der Gruppe I genauer eingegangen. So werden mGluR1s v. a. im Cerebellum und den Mitralzellen des Riechkolbens sowie dem Hippocampus, dem Thalamus und der Substantia nigra exprimiert. Dahingegen konnten mGluR5-Transkripte der Rezeptoren u. a. im cerebralen Cortex, dem Hippocampus, dem Subiculum, dem Riechkolben, dem Striatum und anderen Hirnstrukturen nachgewiesen werden. Die Arbeit von Ferraguti et al. deutet zudem daraufhin, dass mGluR5s nicht im Cerebellum exprimiert werden (Ferraguti und Shigemoto 2006).

#### **1.4 Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität**

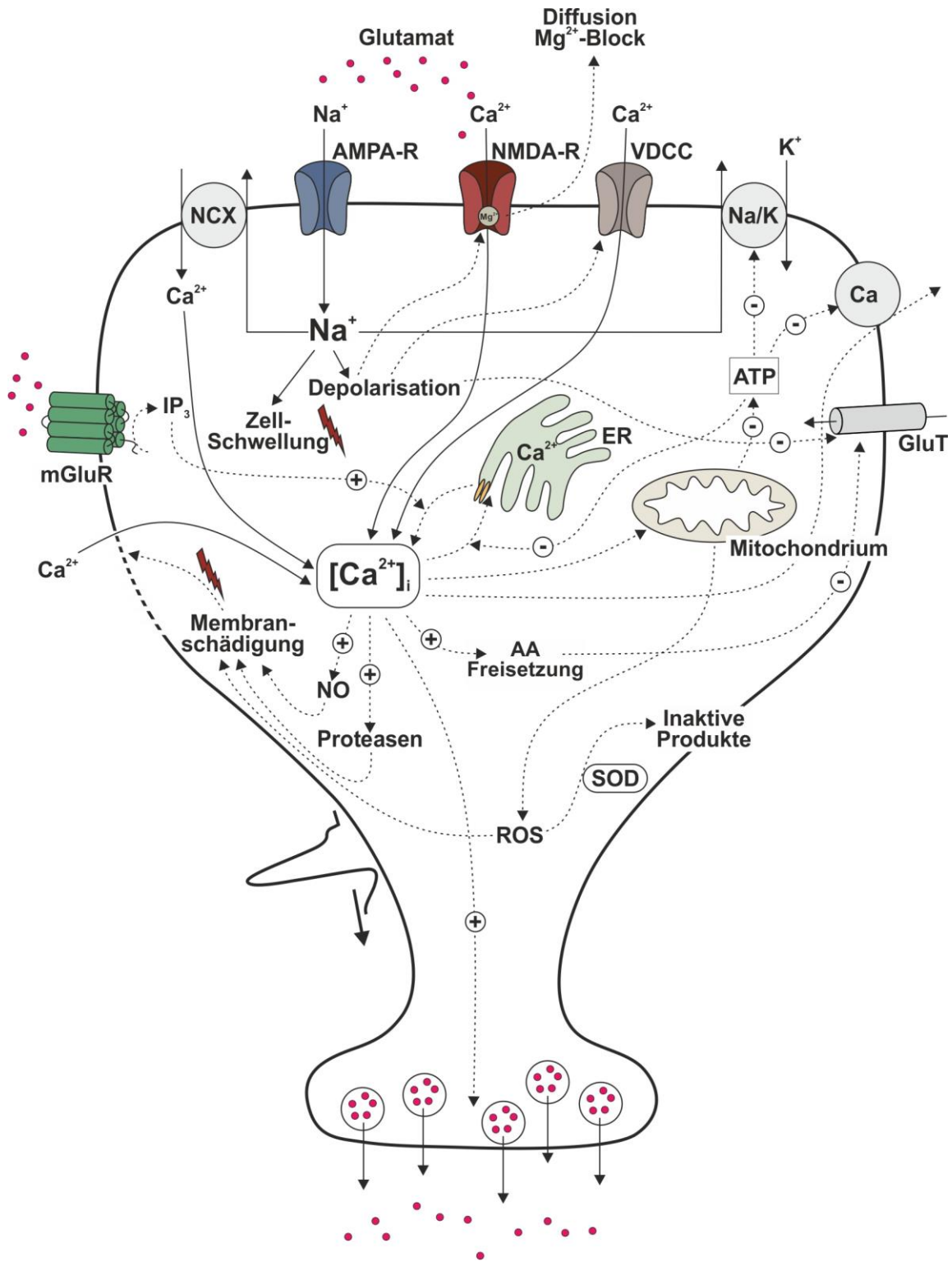
Der von Olney et al. geprägte Begriff Exzitotoxizität beschreibt den Tod einer Nervenzelle infolge der Schädigung durch exzessive und andauernde Stimulation mit exzitatorischen Aminosäuren (EAAs) (Olney 1969). Als EAAs bezeichnet man eine Gruppe strukturell verwandter Aminosäuren, wie beispielsweise Glutamat und Aspartat. Diese besitzen die



Eigenschaft Neurone innerhalb des ZNS zu erregen und wenn sie über einen längeren Zeitraum in entsprechend hoher Konzentration administriert werden zu schädigen (Gillissen et al. 2002). Als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter des ZNS ist Glutamat somit konzentrationsabhängig entweder an der physiologischen Neuronenaktivität (siehe 1.3.1, Physiologische Rolle der NMDA-Rezeptoren) oder an der Schädigung von Neuronen beteiligt. Bereits 1957 wurde der neurotoxische Effekt von Glutamat in einem Retina-Modell der Maus beschrieben. Lucas und Newhouse fanden heraus, dass die Injektion von L-Glutamat zu einer Schädigung der inneren Schichten der Mausretina führt und deckten so die neurotoxische Rolle des Neurotransmitters auf (Lucas und Newhouse 1957). Etwa 10 Jahre später wurde dann von Olney et al. das pathologische Modell zur Aminosäure-induzierten Exzitotoxizität beschrieben (Olney 1969). In zahlreichen nachfolgenden Studien, die das Ausmaß der Kainat-induzierten neuronalen Schädigung in unterschiedlichen Gehirnregionen untersuchten, konnte der neurotoxische Effekt der EAAs bestätigt werden (Schwarcz und Coyle 1977, Coyle et al. 1978, Nadler et al. 1978, Coyle et al. 1981, Gillissen et al. 2002). Im Verlauf der Exposition von Neuronen mit pathologischen Glutamatkonzentrationen kommt es zur Schwellung von Dendriten und zur vakuolären Degeneration neuronaler Somata, die als charakteristische, morphologische Merkmale des nekrotischen Zelltods gelten. Daher wurde zunächst angenommen, dass es infolge der Exzitotoxizität zur Nekrose, d. h. zum unkontrollierten Zelltod der Neurone kommt (Olney 1969, Olney et al. 1971, Olney et al. 1986, Lipton 1999, Gillissen et al. 2002). Jedoch zeigten nachfolgende Untersuchungen, dass es infolge einer gestörten Glutathomöostase, also der Anreicherung von Glutamat im synaptischen Spalt bedingt durch eine gesteigerte präsynaptische Freisetzung bzw. verminderte Wiederaufnahme (Schousboe 1981, Doble 1999), zur Aktivierung verschiedener Zelltodmechanismen kommt. Sowohl morphologische als auch biochemische Merkmale liefern Grund zur Annahme, dass neben nekrotischen Prozessen auch apoptotische Mechanismen am exzitotoxischen Zelltod der Neuronen beteiligt sind (Ankarcrona et al. 1995, Lipton 1999). Man unterscheidet mit der akuten und der verzögerten exzitotoxischen Schädigung zwei Phasen der Exzitotoxizität, (Choi 1988, 1992, Doble 1999). Im Rahmen der akuten Zellschädigung kommt es, durch die Bindung von Glutamat an nicht-NMDA-Rezeptoren, wie beispielsweise AMPA-Rezeptoren, zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle und zur Depolarisation der Zellmembran. Dadurch öffnen u. a. spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle, was zum weiteren Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration ( $[\text{Na}^+]_i$ ) und zur anhaltenden Membrandepolarisation führt. Des Weiteren kommt es zur spannungsabhängigen Aufhebung des  $\text{Mg}^{2+}$ -Blocks der NMDA-Rezeptoren und somit zur glutamatergen Aktivierung dieser, wodurch weitere  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle einströmen. Um das elektrochemische Gleichgewicht infolge des exzessiven Anstiegs der  $[\text{Na}^+]_i$  aufrechtzuerhalten, müssen  $\text{Cl}^-$ -Ionen passiv in das Zelllumen

transportiert werden (Rothman 1985). Die Zunahme der intrazellulären Ionenkonzentration führt zum osmotischen Einstrom von Wasser, wodurch es zur Schwellung der Zelle sowie der Zellorganellen kommt (Olney et al. 1986, Choi et al. 1987, Churchwell et al. 1996, Doble 1999). Dieser, für nekrotischen Zelltod typisch Schädigungsmechanismus, führt letztendlich zur Ruptur der Zellmembran. Bedingt durch die Zellyse kommt es zum Verlust der Membranintegrität und damit zum Austritt intrazellulärer Bestandteile. Nach Beendigung des depolarisierenden Stimulus ist dieser osmotisch bedingte Anteil der Exzitotoxizität zumindest teilweise reversibel. Das Ausmaß der Zellschädigung hängt vom Umfang des  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Einstroms ab, welcher durch den transmembranären  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Gradienten bestimmt wird. Versuche, bei denen extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Ionen durch Cholinchlorid substituiert bzw.  $\text{Na}^+$  freies Medium verwendet wurde, zeigten ein geringeres Ausmaß der exzitotoxischen Glutamatschädigung (Choi et al. 1987, Goldberg und Choi 1993, Doble 1999, Rungta et al. 2015). Neben der osmotischen Schwellung kommt es etwas verzögert zu exzitotoxischen Schädigungsmechanismen, die auf der Überladung der Zelle mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beruhen (Choi 1992, Randall und Thayer 1992, Sattler und Tymianski 2000). Während unter physiologischen Bedingungen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) für gewöhnlich sehr gering ist (ca.  $10^{-7}$  M) (Sattler und Tymianski 2000), kommt es infolge der exzessiven Depolarisation der Zellmembran zu einer Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Eintrittspforte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind u. a. NMDA-Rezeptoren. So lässt sich durch Blockade der NMDA-Rezeptoren die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Neuronenschädigung limitieren (Choi 1988, Gillessen et al. 2002). Zudem bewirken die durch Glutamat ebenfalls aktivierten mGluR1 und mGluR5 die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (ER, Mitochondrien). Infolge der Depolarisation der Zellmembran öffnen auch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Der bereits erwähnte Anstieg der  $[\text{Na}^+]_i$  führt außerdem zur Umkehr des vom  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) vermittelten Ionentransports (Mattson et al. 1989). Unter diesen Bedingungen transportiert NCX  $\text{Na}^+$  im Antiport mit  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus, was den weiteren Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bedingt. Die hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bewirkt die Aktivierung einer Reihe nachgeschalteter Effektormechanismen, die einerseits die Nekrose vorantreiben und andererseits apoptotische Signalwege einleiten. Neben der Schädigung der Mitochondrien kommt es zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen. Daneben werden verschiedene Hydrolyseenzyme, wie beispielsweise Nukleasen, Lipasen und Proteasen, sowie calciumabhängige Kinasen aktiviert. Zudem kommt es bedingt durch die Schädigung der Zellmembran sowie den  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Anstieg zur Förderung der Exozytose von Glutamat aus Vesikeln. Der damit verbundene weitere Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration ist, neben dem exzessiven Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, der dritte ausschlaggebende Faktor für Exzitotoxizität. Darüber hinaus kann es infolge der andauernden Depolarisation der Zellmembran zu einer Verlangsamung oder sogar Umkehrung des Glutamattransports

(siehe 1.2) in Gliazellen und Neurone kommen. Dadurch nimmt die extrazelluläre Glutamatkonzentration weiter zu, was einerseits die Exzitotoxizität und andererseits die Diffusion von Glutamat zu bislang ungeschädigten Neuronen verstärkt. Diese werden dann ebenfalls pathologisch depolarisiert und es entsteht ein Teufelskreis, der zur Ausbreitung und Potenzierung der Exzitotoxizität führt (Doble 1999).



**Abbildung 1.3: Schematische Übersicht über die exzitotoxischen Schädigungsmechanismen**  
 Die exzessive Stimulation von Glutamat führt durch die gesteigerte Aktivierung präsynaptischer ionotroper sowie metabotroper Glutamatrezeptoren zu einer Reihe nachgeschalteter Schädigungsmechanismen die letztendlich zum Zelltod führen. Abbildung modifiziert nach Siegel et al., 1999, S. 502. NCX = Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher; IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; ER = endoplasmatisches Retikulum; AA = Arachidonsäure; NO = Stickstoffmonoxid; ROS= reaktives Sauerstoffradikal; SOD = Superoxiddismutase.

### 1.4.1 Ca<sup>2+</sup>-abhängige mitochondriale Schädigung

Unter physiologischen Bedingungen kontrollieren der NCX, die Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Carafoli 1991) sowie die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das ER und die Mitochondrien (Gunter et al. 1994, Pozzan et al. 1994) die freie [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Insbesondere die mitochondriale Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> hat einen großen Einfluss auf die cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration. Nach Beendigung des physiologischen Stimulus für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und dem anschließenden Abfall der cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration kommt es dann zur Umverteilung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus den Mitochondrien ins Cytoplasma (Werth und Thayer 1994, Peng et al. 1998). Die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in das Mitochondrium führt zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) (Nicholls und Ward 2000). So kommt es unter physiologischen Bedingungen zur Ca<sup>2+</sup>-induzierten transienten Depolarisation der Mitochondrienmembran, was in Folge die mitochondrialen Dehydrogenase (NADH-Dehydrogenase) und ATPase aktiviert. Dies führt zu einem gesteigerten Elektronentransfer innerhalb der mitochondrialen Atmungskette und dem Ausstrom von Protonen ins Cytoplasma. Infolge exzessiver glutamaterger Stimulation der Nervenzellen führt die massive Zunahme der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Überschreitung eines Schwellenwerts der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zum Versagen der Ca<sup>2+</sup>-Regulationsmechanismen (Gillissen et al. 2002). Dies bedingt die anhaltende Depolarisation der Mitochondrienmembran, was zur Schädigung und Funktionsstörung der Mitochondrien führt und letztlich den Zusammenbruch der mitochondrialen Atmungskette hervorruft (Schinder et al. 1996, Nicholls 2004). Bedingt durch die reduzierte oxidative Phosphorylierung kommt es zur verminderten Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion und somit zu einer reduzierten Energiebereitstellung. Durch die massive Energiedepletion der Zelle kann es sogar zur Umkehrung der ATP-Synthese-Aktivität und damit zur Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) kommen. Längerfristig führt dies zur Umstellung der Zelle auf einen anaeroben Stoffwechsel, der mit der Anreicherung von anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>), Laktat und H<sup>+</sup> einhergeht. Die H<sup>+</sup>-bedingte Verringerung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung des Na<sup>+</sup>-/H<sup>+</sup>-Austauschers (NHE), der die intrazelluläre Anreicherung der H<sup>+</sup> reduziert, jedoch gleichzeitig zur Akkumulation von [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> beiträgt (Weinberg, 2000). Aufgrund des ATP-Mangels können aktive Transportprozesse, wie die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> in das ER sowie die Reduktion der intrazellulären Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration durch die Aktivität der Na<sup>+</sup>-/K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPase nicht weiter ablaufen. Dies führt zur Verstärkung der Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Schädigungsmechanismen.

### 1.4.2 Die Rolle von freien Sauerstoffspezies während der Exzitotoxizität

Die Zunahme der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fördert die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS), wie z. B. von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Dabei tragen verschiedene Ca<sup>2+</sup>-abhängige Prozesse zur gesteigerten endogenen ROS-Produktion bei. Zum einen führt die Ca<sup>2+</sup>-abhängige

Schädigung der Mitochondrienmembran zur gesteigerten Formation von ROS, zum anderen kommt es zur  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  (PLA $_2$ ). Dadurch wird die Spaltung von Phospholipiden und die vermehrte Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Zellmembran katalysiert. Durch den Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-vermittelten metabolischen Abbau der AA kommt es zu Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen, wobei als Nebenprodukt ROS gebildet wird. Zudem führt die PLA $_2$ -induzierte Freisetzung von AA zur Schädigung der Zellmembran und fördert so die weitere Freisetzung von Glutamat. Dies führt zur Verstärkung des exzitotoxischen Kreislaufs (Lewen et al. 2000, Gillissen et al. 2002). Viele der gebildeten ROS besitzen nur eine kurze Halbwertszeit und zeigen eine große Reaktivität. Durch die Reaktion mit Sauerstoffmolekülen wird so die Bildung weiterer ROS-Produkte katalysiert. Die Interaktion dieser hochreaktiven Sauerstoffspezies mit Proteinen, Lipiden, Mitochondrien, sowie mitochondrialer und chromosomaler DNA führt zur Störung zellulärer Funktionen und trägt zum neuronalen Zelltod bei. So beeinflussen sich die mitochondriale Dysfunktion und die gesteigerte ROS-Produktion gegenseitig. ROS hemmen verschiedene mitochondriale Enzyme, wie die NADH-Dehydrogenase (NADH: Coenzym-Q-Oxidoreduktase), die Succinat-Dehydrogenase, die ATP-Synthase, die Pyruvat-Dehydrogenase und die Aconitasen des Citratzyklus (Gillissen et al. 2002). Dies führt zum Voranschreiten des Verlustes der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bis hin zur irreversiblen  $\text{Ca}^{2+}$ -Dysregulation (*delayed calcium deregulation*), welche den sicheren Zelltod bedingt (Castilho et al. 1999, Gillissen et al. 2002). Neben der Hemmung der Enzymaktivität trägt ROS zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) bei (Schinder et al. 1996, White und Reynolds 1996). Die Öffnung dieser nichtselektiven, großlumigen Pore, die beide Mitochondrienmembranen durchspannt, erlaubt die vereinfachte Permeabilität von Molekülen bis zu 1500 Da. Die dadurch bedingte weitere Zunahme der intrazellulären Konzentration an beispielsweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen fördert den osmotischen Einstrom von Wasser in das Mitochondrium, was zur Schwellung und Ruptur der Mitochondrienmembran führt. Die Freisetzung proapoptotischer Proteine wie beispielsweise Cytochrom C aus dem Mitochondrium stimuliert letztlich den intrinsischen Signalweg der Apoptose. Zudem verhindert die Öffnung der mPTP die oxidative Phosphorylierung und damit die ATP-Produktion (Gillissen et al. 2002). Studien mit Radikalfängern und Inhibitoren der ROS-Produktion zeigen, dass die Reduktion von ROS zum verminderten Glutamat-induzierten Zelltod führt (Castilho et al. 1999).

### **1.4.3 Die Rolle von Stickstoffspezies während der Exzitotoxizität**

Stickstoffmonoxid (NO) wird in verschiedenen Zelltypen durch die katalytische Wirkung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) gebildet und hat einen Einfluss auf zahlreiche zelluläre Funktionen wie beispielsweise die Freisetzung von Neurotransmittern, die synaptische

Plastizität und die Genexpression. Je nach Lokalisation sind vier verschiedene Isoformen der NOS bekannt: (I) die neuronale NOS (nNOS) sowie deren Spleißvariante in den Mitochondrien mNOS, (II) die induzierbare NOS (iNOS) in Mikroglia und Astrozyten und (III) die endotheliale NOS (eNOS) in den Endothelzellen von Blutgefäßen (Dawson et al. 1991, Dawson und Dawson 1996, Alderton et al. 2001, Gillissen et al. 2002). NO kann nicht vesikulär gespeichert werden, sondern diffundiert nach der Synthese über die Zellmembran und erreicht so verschiedene Kompartimente und unterschiedliche Zelltypen. Die Aktivität von NO wird durch die chemische Reaktion mit verschiedenen Zielmolekülen beendet (Alderton et al. 2001). Zwar ist NO selbst weniger reaktiv als ROS, jedoch kommt es infolge der Reaktion von Stickstoffmonoxidradikalen ( $\cdot\text{NO}$ ) mit Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) zur Formation von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das aufgrund seines hohen Redoxpotentials wesentlich aggressiver ist. Infolge der Reaktion von  $\text{ONOO}^-$  mit Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) kommt es zur Bildung von Nitrosoperoxycarbonat-Ionen ( $\text{ONOOCO}^-$ ), welche weiter in Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) und Carbonat-Ionen ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) zerfallen und zur oxidativen Schädigung von Proteinen, Lipiden, DNA und RNA führen (Dawson und Dawson 1996, Keelan et al. 1999, Gillissen et al. 2002).

#### 1.4.4 Apoptotische Zelltodmechanismen und deren Gegenspieler

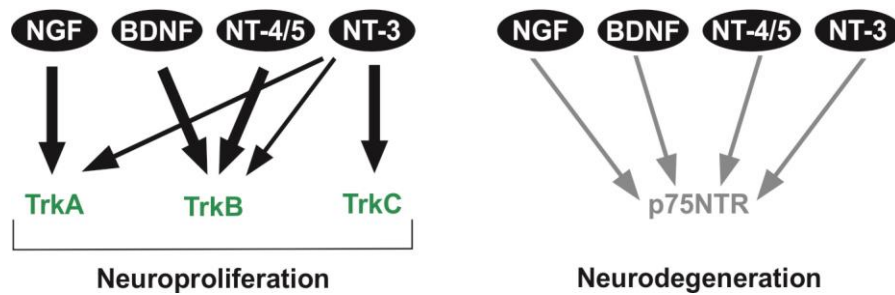
Vor der Entdeckung der Apoptose 1971 wurde jegliche Form des Zelltods als Nekrose bezeichnet (Kerr 1971). Während Nekrose ein passiver Zelltodmechanismus ist, stellt die Apoptose einen aktiven, ATP-abhängigen Prozess dar, der auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird (Kerr et al. 1972). Angestoßen durch ein externes oder internes Todessignal induziert die Zelle ihren eigenen Zelltod. Dabei durchläuft sie charakteristische morphologische Stadien, welche von Kerr et al. erstmal beschrieben wurden. So kommt es im Rahmen der Apoptose zur Kondensation des Chromatins, das sich kugelförmig in der Nähe der Kernmembran anreichert, sowie zur Fragmentierung und Auflösung des Kernkompartiments. Weitere Ereignisse sind ein Schrumpfen der Zellen sowie charakteristische Ausstülpungen der Zytoplasmamembran (*membrane blebbing*). Durch Abschnürung dieser Ausstülpungen entstehen die charakteristischen apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*). Diese werden unter physiologischen Bedingungen von Phagozyten aufgenommen oder im extrazellulären Raum abgebaut. Die Apoptose mündet letztlich in der Fragmentierung der DNA, wobei Fragmente definierter Größen gebildet werden (Kerr et al. 1972, Wyllie et al. 1980). Apoptose kann einerseits durch einen extrinsischen Signalweg über die Aktivierung zellulärer Todesrezeptoren, oder andererseits durch einen intrinsischen Signalweg über die Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranösen Kompartiment des Mitochondriums ausgelöst werden (siehe oben). Zudem existiert ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Aktivierungsweg. Im Rahmen der proapoptotischen

Signalwege besitzen Caspasen eine zentrale Schlüsselrolle. Caspasen sind Cysteinproteasen, die ihre Zielproteine an Peptidbindungen C-terminal von Aspartat schneiden. Im Rahmen apoptotischer Aktivität schneiden die Initiator-Caspasen (z. B. Caspase 2, 8, 9, und 10) die Vorläuferform nachgeschalteter Effektor-Caspasen (z. B. Caspase 3, 6 und 7), die anschließend zelleigene Proteine, wie die Kernmembran oder das Zytoskelett, spalten. Eine wichtige Funktion der Effektor-Caspasen ist die Aktivierung von Nukleasen, die zelluläre DNA spalten. Die verschiedenen Apoptosekaskaden unterscheiden sich in ihrer Initialphase, führen letztlich jedoch alle zur Aktivierung der Caspase 3, welche als Effektor-Caspase die Chromatinkondensation und die DNA-Fragmentierung initiiert (Bayir und Kagan 2008). Initiator-Caspasen können durch verschiedene Enzyme aktiviert werden. So kommt es beispielsweise durch die Interaktion von Liganden wie z. B. Cytokinen, Apo-Protein, Fas-Ligand und Tumornekrosefaktor mit den sogenannten Todesrezeptoren zur Aktivierung dieser und nachfolgend zur Aktivierung von Initiator-Caspasen wie der Caspase 8. Die Mitglieder der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie stellen eine Gruppe apoptoseregulierender Faktoren dar. Neben den proapoptotischen Vertretern Bax (*Bcl-2 associated protein X*), Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) und Bad (*Bcl-2 antagonist of cell death*), zählen zu dieser Familie die antiapoptotisch wirksamen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (*B-cell lymphoma-extra large*). Bcl-2 Faktoren bilden funktionelle Heterodimere. Durch die Bindung von Bax an Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> wird dessen proapoptotische Wirkung unterbunden. Im Rahmen der intrinsischen Apoptosekaskade translokalisieren proapoptotische Proteine wie beispielsweise Bax zu den Mitochondrien wo sie die Freisetzung von Cytochrom C und dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) fördern. Infolge der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C kommt es zur Aktivierung der Caspase 9, welche wiederum die Effektor-Caspase 3 aktiviert (Gillesen et al. 2002, Bayir und Kagan 2008). Allerdings aktiviert Cytochrom C die Apoptosekaskade nicht alleine, vielmehr werden weitere Co-Faktoren dafür benötigt. So fördert AIF die Formation des sogenannten Apotosoms, welches neben Cytochrom C, den Apoptose Protease-aktivierenden Faktor 1 (*Apaf-1, apoptotic protease activating factor 1*), dATP und Procaspase 9 beinhaltet. Die Wirkung antiapoptotischer Faktoren beruht auf der verminderten Freisetzung von Cytochrom C durch Stabilisierung der mitochondrialen Membran. Zudem kommt es infolge der intrazellulären Akkumulation von Ca<sup>2+</sup> zur Aktivierung der Caspase 12.

Neurotrophine sind kleine, sekretorische Proteine die als Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Entwicklung, das Überleben und die Funktion des Nervensystems nehmen (Snider und Johnson 1989, Eide et al. 1993, Korsching 1993, Lewin und Barde 1996, Segal und Greenberg 1996). Bislang wurden in Säugern vier verschiedene Neurotrophine identifiziert: BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Zudem existieren zwei weitere Neurotrophine, Neurotrophin-



6 (Gotz et al. 1994) und -7 (Nilsson et al. 1998), welche ausschließlich in Knochenfischen nachgewiesen werden konnten (Huang und Reichardt 2001). Alle Neurotrophine werden als Vorläuferproteine synthetisiert, und ihre aktiven Formen zeigen eine hohe Sequenzhomologie zueinander. Sie lagern sich zumeist zu funktionellen Homodimeren (Lewin und Barde 1996) zusammen und können ihre Wirkung durch Interaktion mit zwei unterschiedlichen Rezeptorklassen vermitteln. Sie binden einerseits an die Rezeptor-Tyrosinkinasen der Trk-Familie und andererseits an den Neurotrophinrezeptor p75NTR, einen Vertreter der TNF-Rezeptorfamilie. Durch die Interaktion der Neurotrophine mit den Trk-Rezeptoren können verschiedene antiapoptotische Kinasekaskaden, wie z. B. der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)- oder Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg, aktiviert werden. Neurotrophine zeigen dabei unterschiedliche Affinitäten für die drei Trk-Rezeptoren. So bindet NGF mit hoher Affinität an den TrkA-Rezeptor und BDNF sowie NT-4/5 an den TrkB-Rezeptor. NT-3 interagiert mit hoher Bindungsaffinität mit dem TrkC-Rezeptor und mit niedriger Affinität mit TrkA und TrkB. Der p75NTR ist in der Lage alle fünf Neurotrophine zu binden, jedoch mit deutlich geringerer Affinität als die Trk-Rezeptoren (siehe Abbildung 1.4). Infolge der Neurotrophin-Bindung an p75NTR kommt es dagegen zur Aktivierung apoptotischer Signalwege (Chao 1994, Bamji et al. 1998, Chao 2003). Zusätzlich zu den Neurotrophinen sind weitere Polypeptide mit neurotrophen Eigenschaften bekannt, wie beispielsweise GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Henderson et al. 1994), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) (Barbin et al. 1984) sowie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor, FGF*) (Klagsbrun 1991, Korsching 1993). Daneben tragen die Aktivierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (*insulin-like growth factor, IGF*) (D'Mello et al. 1993, Cotman und Berchtold 2002), sowie von TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor- $\beta$ 1*) (Prenn et al. 1993, König et al. 2005) und dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Figiel 2008) zum Zellüberleben der Neurone bei (Semkova und Kriegstein 1999). Aufgrund ihrer limitierten Konzentration in spezifischen Geweben determinieren Neurotrophine die Anzahl an überlebenden Neuronen unter physiologischen Bedingungen. Werden z. B. im Verlauf der Embryogenese frisch gebildete Neurone nicht vernetzt und in das Gewebe integriert, wird die Apoptose dieser überflüssigen oder defekten Neurone induziert. Daneben können Neurotrophine das axonale Wachstum, die Reduktion und Reifung dendritischer Dornen, neuronale Innervationsmuster sowie die Expression verschiedener Proteine, die für die neuronale Funktion essentiell sind (Neurotransmitter und Ionenkanäle), regulieren. Im ausgewachsenen Nervensystem kontrollieren sie so auch synaptische Funktionen und die synaptische Plastizität (McAllister et al. 1999, Huang und Reichardt 2001).



**Abbildung 1.4: Rezeptoraffinitäten der Neurotrophine**

Die Neurotrophine NGF, BDNF, NT-4/5 und NT-3 binden mit hoher Affinität selektiv an einen oder mehrere Tyrosinkinase-Rezeptoren vom TrkA - C Typ, wodurch v. a. neuroprotektive bzw. neuroproliferative Effekte vermittelt werden. Zudem binden alle Neurotrophine mit geringer Affinität an den p75NTR. Diese Interaktion führt zur Induktion neurodegenerativer Mechanismen. Die Pfeilstärke widerspiegelt die jeweilige Bindungsaffinität.

### Antiapoptotische Signalwege: Akt- und ERK1/2-Kaskade

Sowohl die Akt (Proteinkinase B)- als auch die ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*)-Kaskade können die Aktivierung von Caspasen sowie den Einfluss proapoptotischer Faktoren auf das Mitochondrium verhindern. So besitzen diese Signaltransduktionswege eine entscheidende Funktion für das zelluläre Überleben und beeinflussen den Stoffwechsel, das Wachstum, die Proliferation, die Transkription und die Proteinsynthese.

Nach der Bindung von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise NGF an rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen kommt es zur Dimerisierung dieser und zur Autophosphorylierung. Dadurch kann die Translokation von PI3K an den Rezeptor erfolgen, wodurch es zur nachfolgenden Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen der Zellmembran kommt. Dabei werden Phosphoinositide, v. a. Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) gebildet. Diese dienen als Andockstelle für weitere Proteine, wie die Serum-Glucokortikoid-regulierte-Kinase (SGK), die Ribosomale-S6-Kinase (RSK/S6K), Formen der PKC und einige Serin/Threoninkinasen, wie z. B. Akt und deren Aktivator, die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) (Vivanco und Sawyers 2002, Fayard et al. 2011). Durch die PDK1 vermittelte Phosphorylierung von Akt am Threonin 308 kommt es zur partiellen Aktivierung der Kinase (Alessi und Cohen 1998). Aktiviertes Akt kann wiederum durch die Phosphorylierung nachfolgender Effektorproteine verschiedene antiapoptotische Signalwege induzieren. So kann Phospho-Akt (pAkt) den proapoptotischen Faktor Bad hemmen. Dadurch kommt es zur verminderten Freisetzung von Cytochrom C, wodurch die Aktivierung der Caspase 9 ausbleibt (Manning und Cantley 2007). Diese kann zudem direkt durch die Akt-abhängige Phosphorylierung inhibiert werden (Cardone et al. 1998). Darüber hinaus interagiert Akt mit den Transkriptionsfaktoren NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cell*) und CREB (*cAMP response element-binding protein*) und fördert so die Expression neurotropher Faktoren. PIP<sub>3</sub> kann zudem indirekt die PKC aktivieren. Durch die Phospholipase C bedingte Spaltung von PIP<sub>3</sub> entsteht IP<sub>3</sub> und DAG.

DAG führt dann zur Aktivierung der PKC, welche weitere antiapoptotische Signalkaskaden aktivieren kann. Darüber hinaus wirkt pAkt stimulierend auf den ERK1/2-Signalweg. Durch Aktivierung von G-Proteinen, wie Ras (*rat sarcoma*) kommt es zur Aktivierung der ERK1/2-Kaskade (Song et al. 2005, Brugge et al. 2007).

Bislang wurden acht verschiedene Isoformen der ERK identifiziert. Im Folgenden liegt der Fokus auf den beiden Isoformen ERK1 (43 kDa) und ERK2 (41 kDa). Diese zeigen eine große Sequenzhomologie von mehr als 84 % zueinander und teilen viele Funktionen (Roskoski 2012). Als Mitglied der MAP-Kinasefamilie (p44/p42 Mitogen-aktivierte Proteinkinase) geht ihrer Aktivierung ein mehrstufiger Signaltransduktionsweg voraus (Pearson et al. 2001). Im Rahmen der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade werden sequentiell mindestens drei nacheinander geschaltete Kinasen der MAP-Kinasefamilie aktiviert, bevor es durch die Phosphorylierung von Tyrosin und Threonin im aktiven Zentrum des Enzyms zur Aktivierung der Kinasen ERK1/2 kommt. Teil dieser Phosphorylierungskaskade sind auf Ebene 1 die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3K/MAPKKK), nachfolgend auf Ebene 2 die MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K/MAPKK), sowie auf Ebene 3 die MAP-Kinasen (MAPK). Durch die Bindung von z. B. Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen dimerisieren diese und es kommt zur Autophosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). Über die Bindung von Grb2 kann der Nukleotid-Austauschfaktor Sos (*son of sevenless*) an den aktivierten Rezeptor binden (Hwang und Rhee 1999, Wolf und Seger 2002, Roskoski 2012). Dieser Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktor ist in der Lage in der Nähe lokalisierte membranständige Ras-Proteine zu aktivieren, indem er den Austausch von GDP gegen GTP stimuliert (Wellbrock et al. 2004). Der aktive Ras-GTP-Komplex bewirkt eine Konformationsänderung der Effektor kinase Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) (MAP3K), wodurch es zur Dimerisierung und Rekrutierung der Kinase vom Cytosol zur Plasmamembran kommt. Man unterscheidet zwischen drei Raf Isoformen, der a-Raf, b-Raf und c-Raf, wobei c-Raf (Raf-1) am besten untersucht ist. Aktive Raf-Kinasen können MEK1/2-Kinasen (MAP2K) durch Phosphorylierung aktivieren. Durch Phosphorylierung der ERK1/2-Kinasen (MAPK) am Tyrosin 204/187 und Threonin 202/185 werden pMEK1/2 letztendlich aktiviert (Cantwell-Dorris et al. 2011, Roskoski 2012). Aktivierte ERK1/2 katalysiert wiederum die Phosphorylierung von mehr als 50 verschiedenen cytoplasmatischen und nukleären Effektorproteinen, wie beispielsweise regulatorischen Molekülen und Transkriptionsfaktoren (Roskoski 2012). So werden durch pERK1/2 untergeordnete Kinasen, wie Kinasen der RSK-Familie, aktiviert, welche Wachstum, Motilität, Proliferation und das zelluläre Überleben fördern. Diese Familie umfasst sechs verschiedene Mitglieder, so existieren vier humane RSK1 - 4 Isoformen, auch MSK1 und MSK2 (*mitogen- and stress-activated kinase 1/2*) genannt. So ist die RSK2 in die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors CREB involviert, der wiederum die Expression antiapoptotischer Gene induziert. Zudem kann durch die RSK2-vermittelte Phosphorylierung von Bad am Serin 112 dessen proapoptotische Wirkung vermindert werden. Auch ist ERK1/2 in der Lage das Caspase 9-Enzym durch Phosphorylierung am Threonin 125 zu inhibieren (Lu und Xu 2006). Im Rahmen zahlreicher Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 den Verlauf der Apoptose inhibieren kann. Dabei wurde die Induktion der Apoptose infolge verschiedener Stimuli, wie beispielsweise dem TNF, Fas-Ligand, Tumornekrosefaktor-verwandtem Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL), Bestrahlung, osmotischem Stress, Hypoxie, Entzug von Wachstumsfaktoren, NO, Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etc. untersucht (Lu und Xu 2006). Infolge dieser Stimuli kommt es zur transienten oder anhaltenden Aktivierung von ERK1/2, wodurch antiapoptotische Mechanismen in Gang gesetzt werden. Im Gegensatz dazu kommt es durch Blockade von ERK1/2 zur verstärkten Apoptose. Infolge langanhaltender ERK1/2 Stimulation kann es zur Dephosphorylierung und Degradierung von ERK1/2 und somit zum Verlust der antiapoptotischen Wirkung kommen.

## 1.5 Kaliumkanäle der *Slo*-Genfamilie

Die Superfamilie der Kaliumkanäle (K<sup>+</sup>-Kanäle) umfasst eine große Anzahl stark divergenter membrandurchspannender Proteine, welche unter anderem für die Erregbarkeit, sowie die Repolarisation von Neuronen und Muskelfasern verantwortlich sind (Atkinson et al. 1991). Die Kanalpore eines funktionellen K<sup>+</sup>-Kanals wird in der Regel durch Zusammenlagerung von zwei bis vier  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet. Je nach struktureller Zusammensetzung der Kanäle unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Klassen (Familien), welche sich in der Anzahl der Transmembrandomänen ihrer  $\alpha$ -Untereinheiten unterscheiden (Jenkinson 2006, Kuang et al. 2015). So bilden die Vertreter der einwärts rektifizierenden K<sup>+</sup>-Kanäle (Kir) funktionelle Kanäle, deren Untereinheiten aus zwei Transmembrandomänen (2 TM) bestehen. Die  $\alpha$ -Untereinheiten der zweiporigen K<sup>+</sup>-Kanäle (*tandem pore domain potassium channels*) setzen sich aus vier Transmembrandomänen (4 TM) zusammen. Durch Zusammenlagerung von je zwei  $\alpha$ -Untereinheiten kommt es jedoch zur Ausbildung von Homodimeren, wodurch die funktionalen Kanäle eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Kir-Kanälen aufweisen (Goldstein et al. 1998, Buckingham et al. 2005). Zur dritten und größten Klasse gehören Kanäle mit sechs (6 TM), im Ausnahmefall auch sieben Transmembrandomänen (7 TM). Dazu zählen spannungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle, Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-aktivierbare Kanäle, sowie pH-sensitive Kanäle (Sandhiya und Dkhar 2009, Gonzalez et al. 2012).

Die Gruppe der *Slo*-Genfamilie zählt zu den ionensensitiven Kaliumkanälen. Charakteristischerweise weisen ihre Mitglieder (Slo1, Slo2.1 und Slo2.2, sowie Slo3) eine hohe Leitfähigkeit auf (Atkinson et al. 1991, Adelman et al. 1992, Butler et al. 1993). Die

einzelnen Vertreter dieser Kanalfamilie unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau und somit auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Während die beiden Slo2-Kanäle, Slick (Slo2.1, *sequence like an intermediate conductance K<sup>+</sup> channel*) und Slack (Slo2.2, *sequence like a calcium activated K<sup>+</sup> channel*), sechs membrandurchspannende Domänen besitzen, stellen der Slo1- und Slo3-Kanal die beiden einzigen Vertreter der 7 TM-Kanäle dar. Aufgrund der zusätzlichen S0 Domäne dieser Kanäle, ist der Amino-Terminus im Gegensatz zu dem der Slo2-Kanäle extrazellulär lokalisiert (Meera et al. 1997, Salkoff et al. 2006). Eine Gemeinsamkeit der Slo-Kanalfamilie stellt der lange, intrazellulär lokalisierte Carboxy-Terminus dar. Dieser ermöglicht die Interaktion mit intrazellulären Ionen, sekundären Botenstoffen, sowie anderen Proteinen (Salkoff et al. 2006). Der Slo1-Kanal (BK, Maxi-K), ist der bekannteste Vertreter der Slo-Genfamilie. Die Aktivierbarkeit dieses Kanals kann sowohl durch den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration als auch durch die Änderung des Membranpotentials erfolgen (Salkoff et al. 2006). Der Slo3-Kanal weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zum BK-Kanal auf, wird aber nicht durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen, sondern durch die Änderung des pH-Werts aktiviert (Xia et al. 2004, Zhang et al. 2006). Bislang wurde die Expression des Slo3-Kanals jedoch ausschließlich im Hoden und dort speziell in den sich entwickelnden Spermatozyten der Samenkanälchen nachgewiesen (Schreiber et al. 1998). Die beiden paraloguen Slo2-Kanäle, Slick und Slack, sind eng miteinander verwandt. Sie besitzen eine zu 74 % identische Aminosäuresequenz und auch ihr struktureller Aufbau ist weitestgehend gleich (Salkoff et al. 2006). Zudem kommt es zu Überschneidungen in den Expressionsmustern der beiden Kanäle. Slick wird ubiquitär in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. So wurden in Mäusen mSlo2.1-Transkripte u. a. im Gehirn, im Herzen, in Skelettmuskelzellen, in der Niere, den Hoden, der Lunge und der Leber nachgewiesen (Yuan et al. 2003). Auf die Expressionsmuster, die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Funktion des Slack-Kanals wird im nachfolgenden Kapitel 1.5.1 genauer eingegangen. Die größte Divergenz zwischen Slick und Slack besteht in der Struktur und Funktion des Carboxy-Terminus (Salkoff et al. 2006). Zwar erfolgt die Aktivierung beider Kanäle durch einen Anstieg der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, jedoch interagieren die Na<sup>+</sup>-Ionen mit unterschiedlichen Na<sup>+</sup>-Bindungsstellen (Thomson et al. 2015). Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum für die Aktivierung der Slack-Kanäle geringere [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> notwendig sind als für Slick. So wird für die Aktivierung von Slack ein EC<sub>50</sub>-Wert für [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> von ~ 40 mM angegeben, während dieser für Slick bei ~ 89 mM liegt. Allerdings weisen Slick-Kanäle auch in Abwesenheit von Na<sup>+</sup>-Ionen eine basale Aktivität auf (Kaczmarek 2013). Auch zeigen Slick-Kanäle eine im Vergleich zu Slack-Kanälen erhöhte Sensitivität gegenüber Cl<sup>-</sup>-Ionen (Yuan et al. 2000, Kaczmarek 2013). Zudem enthält der C-Terminus des Slick-Kanals ein ATP-Bindungsmotiv (CXXXXCKT). Dahingegen wurde eine solche ATP-Bindungsstelle für Slack bislang nicht

identifiziert. Dabei wurde zunächst postuliert, dass es in Gegenwart von ATP zu einer negativen Modulation des Slick-Kanals und somit zu einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit kommt (Bhattacharjee et al. 2003). Zwischenzeitlich existieren jedoch kontroverse Arbeiten die diesen Befund nicht bestätigen können. Weder Berg et al. noch Garg et al. konnten eine Inhibierung des Kanals durch ATP feststellen (Berg et al. 2007, Garg und Sanguinetti 2014). Zudem ist bekannt, dass meist Slick- oder Slack-Homomere gebildet werden. Im Fall der gleichzeitigen Expression von Slick und der Slack-B-Isoform hingegen kommt es auch zur Bildung heteromerer Slick-/Slack-B-Tetramere. Diese Kanäle unterscheiden sich maßgeblich in ihren kinetischen Eigenschaften, ihrer Leitfähigkeit, der subzellulären Lokalisation, sowie ihrer Aktivierbarkeit durch die PKC von den homomeren Slick- bzw. Slack-Kanälen (Chen et al. 2009).

### 1.5.1 Der Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanal Slack

In der Literatur wurden Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle (K<sub>Na</sub>) erstmals 1984 beschrieben. Mittels *Patch-Clamp*-Messungen an Herzmuskelzellen des Meerschweinchens wurden Kaliumströme großer Leitfähigkeit (~ 210 pS) gemessen, die in konzentrationsabhängiger Weise durch [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> induziert werden. Diese Ströme zeigten zudem eine vernachlässigbare Spannungsabhängigkeit sowie keine Sensitivität gegenüber [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Die zur Aktivierung der Kanäle benötigte intrazelluläre [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> (EC<sub>50</sub> = 66 mM) lag jedoch außerhalb des physiologischen Bereichs (Kameyama et al. 1984). In den darauffolgenden Jahren wurden solche Na<sup>+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Ströme auch in Neuronen verschiedener Zelltypen nachgewiesen (Bader et al. 1985, Dryer 1991, Egan et al. 1992, Dryer 1994, Safronov und Vogel 1996, Yuan et al. 2000). Die zur Aktivierung dieser neuronalen K<sub>Na</sub> benötigten EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 30 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> und die gemessene Leitfähigkeit betrug 170 pS (Bader et al. 1985, Dryer et al. 1989, Schwindt et al. 1989). Die Messung von Strömen einzelner K<sub>Na</sub>-Kanäle in Neuronen zeigte auf, dass sich deren Leitfähigkeit (107 pS) stark von der Leitfähigkeit der K<sub>Na</sub>-Kanäle in Ganzzellsystemen unterscheidet (Dryer 1991, Egan et al. 1992, Dryer 1994). Durch Aufklärung der molekularen Struktur dieser K<sub>Na</sub>-Kanäle konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den identifizierten Kanälen um Mitglieder der *Slo*-Genfamilie handelt (Bhattacharjee et al. 2003, Yuan et al. 2003). Im Jahr 1998 gelang der Gruppe um Joiner et al. die Expression und Charakterisierung eines Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals, der aufgrund seiner Sequenzhomologie mit dem Slo1-Kanal den Namen Slack (*sequence like a calcium-activated K<sup>+</sup> channel*) erhielt. Durch das *Screening* einer Gendatenbank nach Fragmenten die für Proteine codieren, welche die für K<sup>+</sup>-Kanäle spezifische Signatursequenz TXXTXGYG (Heginbotham et al. 1992) enthalten, stieß die Gruppe auf ein Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, welches große Ähnlichkeit zum bekannten Slo1-Gen besaß. Anhand dieser Genstruktur konnte der Slack-Kanal aus dem Gehirn einer Ratte kloniert

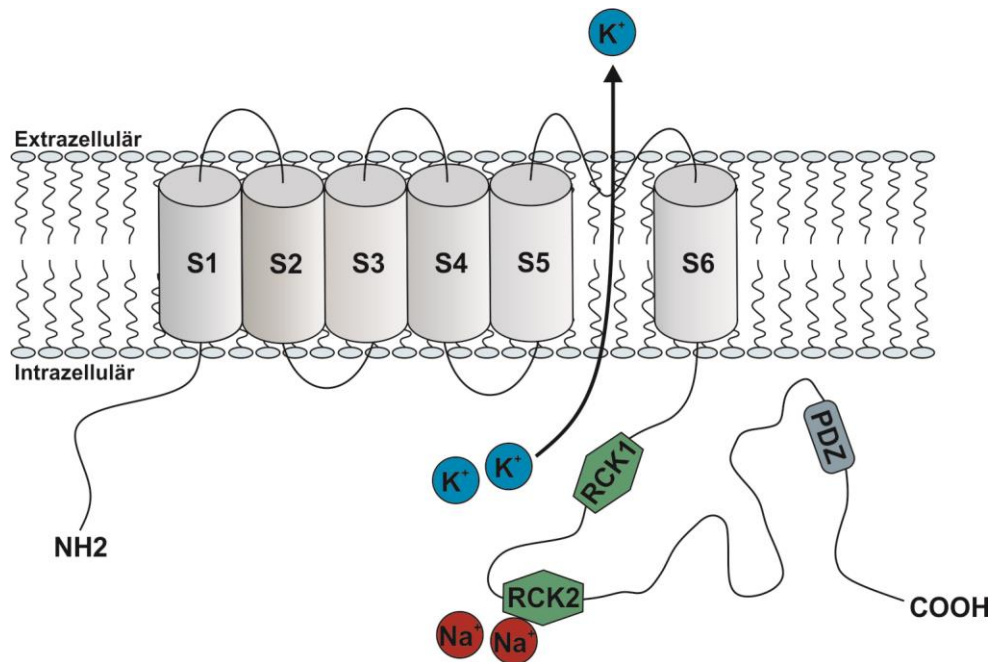
werden (Joiner et al. 1998). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass die Porendomäne und das S6 Segment von Slack zwar strukturelle Homologien zum Slo1-Kanal (siehe 1.5) aufweisen, jedoch große Unterschiede in den funktionellen Eigenschaften beider Kanäle bestehen. So fehlt dem Slack-Kanal die zur Interaktion mit  $\beta$ -Untereinheiten benötigte S0 Domäne. Auch enthält die S4 Domäne keine positiv geladenen Aminosäurereste, wodurch sich Änderungen in der spannungsabhängigen Aktivierbarkeit des Kanals ergeben (Atkinson et al. 1991, Schreiber et al. 1998, Salkoff et al. 2006). Des Weiteren wird Slack im Gegensatz zu Slo1 durch die Anwesenheit größerer Konzentrationen an  $[Ca^{2+}]_i$  gehemmt statt aktiviert. Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass die Untersuchungen zur Ionen-abhängigen Aktivierbarkeit von Slack in  $Na^+$ -freiem Milieu durchgeführt wurden, wodurch die generelle Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals sehr gering war (Joiner et al. 1998). Zudem wurde gezeigt, dass die insgesamt Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von Slack und Slo1 nur bei 7 % liegt (Joiner et al. 1998, Bhattacharjee und Kaczmarek 2005). Infolge der gleichzeitigen Expression von Slo1 und Slack in *Xenopus laevis* Oozyten konnte die Bildung von Heteromultimeren nachgewiesen werden. Deren elektrophysiologische Eigenschaften stimmen dabei weder mit denen homomerer Slack- noch Slo1-Kanälen überein. So zeigen die Heteromultimere zwar eine ähnliche  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung wie Slo1-Homomultimere, jedoch liegt ihre Leitfähigkeit zwischen denen der Slack- und Slo1-Homomere (Joiner et al. 1998, Chen et al. 2009). 2000 wurde durch Yuan et al. der erste als Slo2 bezeichnete Ionenkanal aus *Caenorhabditis elegans* kloniert. Seine Aminosäuresequenz und die des zuvor klonierten Säuger-Orthologen rSlack weisen eine 41 %-ige Homologie zueinander auf (Yuan et al. 2000). Elektrophysiologische Studien zeigten, dass dieser Slo2-Kanal durch  $Na^+$ -Ionen aktiviert wird und das  $Cl^-$ -Ionen einen synergistischen Einfluss auf diese  $Na^+$ -abhängige Aktivierung haben. So liegen die zur Aktivierung von Slack benötigten  $EC_{50}$ -Werte in Abhängigkeit von der  $[Cl^-]_i$  zwischen 15 mM (160mM  $[Cl^-]_i$ ) und 70 mM (10mM  $[Cl^-]_i$ )  $[Na^+]$  (Yuan et al. 2003). Zudem wurde nachgewiesen, dass der Kanal durch die Kombination von  $Ca^{2+}$ - und  $Cl^-$ -Ionen aktiviert werden kann. In Abwesenheit von  $Na^+$  hingegen wird der Kanal durch die Zugabe von  $Ca^{2+}$ -Ionen gehemmt (Yuan et al. 2000). Nachfolgend identifizierte die Gruppe um Bhattacharjee et al. ein paraloges Säuger-Gen, welches für den ebenfalls  $Na^+$ -abhängigen  $K^+$ -Kanal Slo2.1 (Slick) codiert. Durch Klonierung der beider Slo2-Kanäle aus dem Rattengehirn und der Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (CHO-Zellen) konnten die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Kanäle genauer untersucht und verglichen werden (Bhattacharjee et al. 2003).

## 1.5.2 Topologie und Expression von Slack

### Topologie

Die funktionelle Kanalpore des Slack-Kanals wird durch die Zusammenlagerung von vier identischen  $\alpha$ -Untereinheiten (siehe Abbildung 1.5) in der Zellmembran ausgebildet. Jede dieser Untereinheiten setzt sich aus sechs hydrophoben Transmembrandomänen (S1 - S6) zusammen, wobei sich zwischen der S5 und S6 Domäne die Porenregion mit dem  $K^+$ -Selektionsfilter befindet (siehe 1.5.1) (Bhattacharjee et al. 2002). Wie bereits erwähnt besitzt der Slack-Kanal einen für die *Slo*-Kanalfamilie typischen, langen intrazellulären Carboxy-Terminus. Dieser enthält neben den beiden, für die Kanalfamilie ebenfalls typischen, RCK-Domänen (*regulator of conductance of  $K^+$* ) (Jiang et al. 2001, Yuan et al. 2003) mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die PKA und PKC (Salkoff et al. 2006, Nuwer et al. 2010). Außerdem enthält das C-terminale Ende jeder Slack  $\alpha$ -Untereinheit ein PDZ (*postsynaptic density 95/disc large/zona occludens*)-Bindungsmotiv (Yuan et al. 2003). Dieses ermöglicht die Interaktion des Kanals mit zellulären Proteinen, wie beispielsweise dem postsynaptischen PSD-95-Protein (*postsynaptic density protein 95*). Die Ausbildung von Slo2.2-/PSD-95-Komplexen ermöglicht die Anreicherung des Kanals im Bereich der postsynaptischen Dichte der Synapsen. Dadurch kann der Kanal beispielsweise mit ionotropen Glutamatrezeptoren, welche ebenfalls durch Bindung an PSD-95 im Bereich der postsynaptischen Membran angereichert sind, interagieren (Liu et al. 1998, Uchino et al. 2003). Die RCK 2-Domäne, enthält eine hoch konservierte Aminosäuresequenz, welche für die Aktivierbarkeit des Kanals durch  $Na^+$  verantwortlich ist (siehe 1.5.1). Dieses Bindungsmotiv weist eine große Ähnlichkeit zu den  $Na^+$ -Bindungsstellen anderer  $Na^+$ -sensitiver Kanäle (z. B. Kir 3.2-/Kir 3.4-Kanäle) auf (Zhang et al. 2010). Die  $Cl^-$ -Sensitivität des Kanals wird, zumindest in *Caenorhabditis elegans* Slo2.2, durch ein C-terminales Bindungsmotiv (*chlorid-bowl*) mediiert, welches v. a. positiv geladene Aminosäurereste enthält und befindet sich in analoger Position zur *Calcium-bowl* des BK-Kanals (Yuan et al. 2000). In Mutationsstudien an orthologen rSlack-/rSlick-Kanälen führt ein Aminosäuretausch innerhalb dieser Region jedoch zu keiner Veränderung in der  $Cl^-$ -Sensitivität. Daher scheinen hier andere Strukturen für die  $Cl^-$ -abhängige Co-Aktivierung des Kanals verantwortlich zu sein (Bhattacharjee et al. 2003). Trotz fehlender positiv geladener Aminosäurereste in S4 zeigt Slack eine moderate Spannungsabhängigkeit. Es ist bislang noch nicht geklärt wie diese vermittelt wird (Meera et al. 1997, Yuan et al. 2003, Salkoff et al. 2006).





**Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau einer  $\alpha$ -Untereinheit des Slack-Kanals**

Die Kanaluntereinheiten des Slack-Kanals weisen sechs Transmembrandomänen (grau) auf. Zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment befindet sich die Porenregion mit dem Kaliumselektionsfilter. Der Amino- und Carboxyterminus des Kanals sind intrazellulär lokalisiert. Das lange C-terminale Ende beinhaltet zwei RCK-Domänen (grün) und das PDZ-Bindungsmotiv (grau).

## Die verschiedenen Slack-Isoformen

Bislang konnten in Nagetieren fünf durch alternatives Spleißen entstandene mRNA-Transkripte von Slack nachgewiesen werden. Diese bilden funktionelle Kanäle aus, die sich maßgeblich in der Aminosäuresequenz ihrer Amino-Termini, sowie ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden. Außerdem weisen die Slack-Isoformen Unterschiede in ihren Expressionsmustern, sowie der Interaktion mit anderen Kanaluntereinheiten auf (Brown et al. 2008). Neben der zuerst identifizierten Slack-B-Isoform (Joiner et al. 1998, Yuan et al. 2003) existieren noch die Slack-A-Isoform, sowie je eine Spleißvariante von Slack-B und Slack-A, welche als Slack-Bx2 und Slack-Ax2 bezeichnet werden, und die Slack-M-Isoform (Brown et al. 2008). Das für Slack kodierende *Slc2.2*-Gen besteht aus mehr als 30 Exons. Dabei kodieren zwei alternative Exons für den Amino-Terminus der Slack-A- bzw. Slack-B-Isoform. Das für die Slack-B-Isoform kodierende Exon 1b ist 153 bp lang und befindet sich etwa 13,8 kb strangaufwärts vom 93 bp umfassenden Exon 1a, welches für Slack-A kodiert. Den zwei Spleißvarianten dieser beiden Isoformen, *Slack-Ax2* und *-Bx2*, fehlt jeweils das Exon 2. Interessanterweise zeigen die Amino-Termini der beiden Slack-A-Isoformen eine große Übereinstimmung (78,1 %) mit dem Amino-Terminus von Slick. Andererseits weisen die beiden Exons 1a und 1b kaum Übereinstimmungen in ihrer Sequenz auf (7,7 %). Die Aminosäuresequenzen der N-Termini beider Slack-B-Isoformen zeigen nur eine geringe Übereinstimmung mit Slick, dafür aber eine große Ähnlichkeit mit den N-Termini der

restlichen Vertreter der *Slo*-Genfamilie. Da bisher keine Isoform bekannt ist, die sowohl Exon 1a als auch 1b enthält, wird angenommen, dass die Expression dieser A- und B-Isoformen durch unterschiedliche Promotoren reguliert wird. Über die Slack-M-Isoform ist bislang nur wenig bekannt. Die N-terminale Aminosäuresequenz dieser Isoform unterscheidet sich maßgeblich von denen der anderen Isoformen und wird durch einen Genabschnitt kodiert, der sich direkt vor dem Exon 1 befindet (Brown et al. 2008). In *Whole-Cell Patch-Clamp*-Messungen an CHO-Zellen, welche die Slack-A- und Slack-B-Isoformen exprimieren, konnten unterschiedliche kinetische Eigenschaften der Kanäle aufgezeigt werden. Während Slack-A-Kanäle, ähnlich wie die Slick-Kanäle eine schnelle Aktivierungskinetik zeigen (Brown et al. 2008), öffnen Slack-B-Kanäle erst mit zeitlicher Verzögerung (Joiner et al. 1998, Bhattacharjee et al. 2003). Elektrophysiologische Untersuchungen von Brown et al. deuten jedoch darauf hin, dass Slack-B-Kanäle ebenfalls direkt nach ihrer Aktivierung öffnen, jedoch nur bis zu einem Zustand geringer Leitfähigkeit. Die vollständige Öffnung der Kanäle und die damit verbundene Zunahme der Leitfähigkeit erfolgt verspätet und es dauert einige 100 ms bis sich ein *steady-state* Satus einstellt. Darüber hinaus wurde die Leitfähigkeit der verschiedenen Slack-Isoformen in der *inside-out* Konfiguration in Slack-A- und -B-cRNA transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten untersucht. Dabei zeigen Slack-A-Kanäle eine nahezu identische Leitfähigkeit wie Slick-Kanäle. Diese Kongruenz kann durch die strukturelle Ähnlichkeit der cytoplasmatischen N-Termini der Kanäle erklärt werden. Die mittlere Leitfähigkeit der beiden Slack-Isoformen (~ 180 pS) ist jedoch etwas höher als die von Slick (~ 140 pS) (Bhattacharjee et al. 2003, Brown et al. 2008). Allen Slo2-Kanälen gemein ist die Existenz multipler Zwischenstufen mit geringerer Leitfähigkeit (*subconductance states*). Jedoch konnten Unterschiede in der mittleren Öffnungsdauer der Slack-Isoformen ausgemacht werden. So ist diese für Slack-B etwa 6-mal größer als für die Slack-A-Isoform. Dies liegt u. a. daran, dass Slack-B-Kanäle signifikant längere maximale Öffnungszustände aufweisen als Slack-A-Kanäle (Bhattacharjee et al. 2003, Brown et al. 2008).

### **Expression von Slack und seinen Isoformen**

Die Expressionsmuster der Slo2-Kanäle zeigen große Überschneidungen. Im Rahmen von Expressionsuntersuchungen wurden Slack- und Slick-Kanäle v. a. in Regionen nachgewiesen, in denen zuvor bereits Na<sup>+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Ströme beobachtet wurden (Bhattacharjee et al. 2002, Bhattacharjee et al. 2003). Dabei beschränkt sich v. a. die Expression von Slack fast ausschließlich auf erregbare Zellen, wie z. B. Kardiomyozyten (Kameyama et al. 1984) und Neurone (Joiner et al. 1998, Yuan et al. 2003). Zudem konnte in der Niere (Paulais et al. 2006) und im Hoden (Yuan et al. 2003) Slack-mRNA nachgewiesen werden. In Expressionsstudien an Gehirnen von Ratten wurden isoformspezifische

Unterschiede aufgedeckt (Brown et al. 2008). Mittels *in-situ*-Hybridisierung sowie immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Slack-B-Isoform hauptsächlich im olfaktorischen Bulb, dem Mittelhirn und Hirnstamm exprimiert wird (Joiner et al. 1998, Bhattacharjee et al. 2002). Dahingegen zeigten IHC-Färbungen im Cortex, Cerebellum und Hippocampus nur eine geringe Slack-B Immunreaktivität, während *in-situ*-Hybridisierungsstudien auf eine Slack-Expression in diesen Hirnregionen hindeuten (Joiner et al. 1998, Bhattacharjee et al. 2002, Bhattacharjee et al. 2005). Diese Kontroverse kann dadurch erklärt werden, dass die IHC-Färbungen mit einem Slack-B spezifischen Antikörper durchgeführt wurden, weshalb nur die Slack-B-Isoform nachgewiesen werden konnte. Mittels *in-situ*-Hybridisierung hingegen werden beide Slack-Isoformen simultan detektiert. Diese Befunde deuten somit daraufhin, dass in den betroffenen Gehirnregionen v. a. die Slack-A-Isoform exprimiert wird. Aufgrund der großen Kongruenz zwischen den Amino-Termini von Slack-A und Slick steht kein spezifischer, N-terminaler Slack-A Antikörper zur Verfügung, weshalb der selektive Nachweis dieser Isoform mittels IHC-Färbungen nicht möglich ist. Jedoch ermöglicht der pan-Slack Antikörper, welcher gegen den C-Terminus von Slack gerichtet ist, die simultane Detektion beider Slack-Isoformen. Dieser Antikörper zeigt eine ausgeprägte Immunreaktivität im olfaktorischen Bulb, Hippocampus, sowie in der MNTB (*medial nucleus of the trapezoid body*)-Region des auditorischen Systems. Parallele IHC-Studien mit Slack-B und pan-Slack Antikörpern, erlauben Rückschlüsse auf die Expression der Slack-A-Isoform. So sind Slack-A exprimierende Regionen beispielsweise die Dendriten der Granularzellen sowie der Gyrus dentatus des Hippocampus (Brown et al., 2008). Die für die vorliegende Arbeit essentielle Expression von Slack in den Granularzellen des Cerebellums wurde durch Untersuchungen von Bausch et al. bestätigt. Mittels qRT-PCR Expressionsanalysen sowie IHC-Färbungen konnte die Expression beider Slack-Isoformen in den cerebellären Granularzellen verifiziert werden. Zudem liefern die mit dem Slack-B Antikörper durchgeführten IHC-Färbungen den Nachweis für die Expression dieser Isoform in der Molekularzellschicht des Hippocampus (Bausch et al. 2015). Die für die nachfolgenden Experimente ebenfalls essenzielle Expression von Slack im Striatum wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig aufgezeigt (siehe 4.1.1).

### **1.5.3 Einfluss von Slack auf physiologische/pathophysiologische Prozesse**

Wie bereits in Abschnitt 1.5 beschrieben, zeigen  $K_{Na}$ -Kanäle zahlreiche charakteristische Eigenschaften, wie beispielsweise die Sensitivität gegenüber  $[Na^+]_i$ , eine große Leitfähigkeit, sowie die Existenz verschiedenen Öffnungszustände geringerer Leitfähigkeit (Yuan et al. 2003). Ein protektiver Einfluss dieser  $K_{Na}$ -Kanäle auf die Kardiomyozyten während ischämischer Zustände wurde bereits mehrfach postuliert (Kameyama et al. 1984, Luk und Carmeliet 1990, Haddad und Jiang 1993, Dryer 1994). Aufgrund der vorwiegend neuronalen

Expression der Slack-Kanäle, der Aktivierbarkeit durch  $\text{Na}^+$ -Ionen, sowie ihren elektrophysiologischen Eigenschaften wird angenommen, dass diese ebenfalls im Rahmen neurologisch-pathologischer Prozesse eine Rolle spielen. Im Folgenden soll daher hauptsächlich die funktionelle Rolle der Slack-Kanäle innerhalb des Nervensystems genauer beleuchtet werden.

### **Funktion des Slack-Kanals während physiologischer Neuronenaktivität**

Aufgrund der hohen  $[\text{Na}^+]_i$  die zur Aktivierung von Slack notwendig sind, wurde die Rolle des Kanals unter physiologischen Bedingungen zunächst kontrovers diskutiert. Lange Zeit ging man von einer ausschließlichen Slack-Aktivität unter pathophysiologischen Bedingungen aus. Mittlerweile konnte die Funktion des Kanals während physiologischer Neuronenaktivität nachgewiesen werden (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005, Kaczmarek 2013). So konnte die Beteiligung von Slack an der Kontrolle und Stabilisierung des Ruhemembranpotentials nachgewiesen werden (Kaczmarek 2013). Die Natriumkonzentration in ruhenden, unstimulierten Neuronen liegt bei  $\sim 4 - 15 \text{ mM}$  (Rose 2002, Kaczmarek 2013). Tamsett et al. konnten zeigen, dass diese  $\text{Na}^+$ -Konzentration durchaus ausreichend für eine Aktivierung der Slack-Kanäle in intakten Neuronen unter Ruhebedingungen ist (Tamsett et al. 2009). So zeigen die Kanäle nach Zugabe von  $\text{NAD}^+$  eine erhöhte Sensitivität gegenüber  $[\text{Na}^+]_i$ . In Dorsalwurzelganglien von Ratten lagen die  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aktivierung von Slack in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  im physiologischen Bereich (Tamsett et al. 2009). Auch zeigen Slack-KO Mäuse distinkte Lerndefizite. In vergleichenden Verhaltensstudien konnte aufgezeigt werden, dass die Deletion des Slack-Kanals zu einer leicht reduzierten allgemeinen Bewegungsaktivität sowie einer verminderten kognitiven Flexibilität führt (Bausch et al. 2015). Zudem ist die physiologische Slack Aktivität essentiell für eine normale soziale Interaktion (Bausch et al. 2018). Hauptsächlich spielen neuronal exprimierte  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanäle jedoch während hochfrequenter Neuronenaktivität eine Rolle. So kommt es z. B. infolge wiederholter, tetanischer Stimuli zur Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle und ionotroper Glutamatrezeptoren, und dadurch bedingt zum Einstrom von  $\text{Na}^+$  in das Innere der Zelle. Dies führt zur lokalen Erhöhung der  $[\text{Na}^+]_i$  und nachfolgend zur Aktivierung von  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanälen, wie beispielsweise dem Slack-Kanal. Durch den langanhaltenden Ausstrom von  $\text{K}^+$ -Ionen kommt es zur Hyperpolarisation (*slow afterhyperpolarization* (sAHP)) der Membran. Die dadurch bedingte langanhaltende Hemmung der Nervenerregbarkeit beruht neben der Aktivierung  $\text{Na}^+$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle (Kim und McCormick 1998, Kaczmarek 2013) auf der Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanälen (Kubota und Saito 1991). Die Beteiligung der  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanälen an der Hyperpolarisation wurde zunächst in den Pyramidenzellen des sensomotorischen Cortex von Katzen (Schwindt et al. 1989) und nachfolgend in einer Vielzahl an Neuronen nachgewiesen (Kubota und Saito 1991, Kim und

Mccormick 1998, Sandler et al. 1998, Sanchez-Vives et al. 2000, Franceschetti et al. 2003, Descalzo et al. 2005, Kaczmarek 2013). Darüber hinaus können  $K_{Na}$ -Kanäle das *Timing* einzelner Aktionspotentiale während sogenannten *Bursts* (Salven an Aktionspotentialen) beeinflussen. So führt ihre Aktivierung während der *Bursts* zur Anpassung der Impulsfrequenz und somit zur Modulation rhythmischer Aktivitätsmuster der Aktionspotentiale (Kim und Mccormick 1998, Nuwer et al. 2010). In Elektrozyten elektrischer Fische kommt es infolge der Aktivierung von Neuronen zu solchen Salven hochfrequenter Aktionspotentiale (500 Hz). Interessanterweise exprimieren diese Zellen eine große Anzahl an  $K_{Na}$ -Kanälen. Der Beitrag dieser Kanäle zur Repolarisation ist ursächlich dafür, dass diese Zellen überhaupt in der Lage sind hochfrequenten Aktionspotentiale zu generieren (Markham et al. 2013). Neurone der MNTB-Region zeigen ebenfalls eine hochfrequente Neuronenaktivität (800 Hz). Für die biologische Funktion dieser Neurone ist ein akkurates *Timing* der Aktionspotentiale unerlässlich. Aufgrund der hohen Expressionslevel der Slo2-Kanäle in dieser Region sowie ihrer Lokalisation in räumlicher Nähe zu AMPA-Rezeptoren und spannungsabhängigen  $Na^+$ -Kanälen wird postuliert, dass Slack und Slick die zeitliche Genauigkeit mit der die Aktionspotentiale gesendet werden positiv beeinflussen können (Yang et al. 2007). Aufgrund der vielfältigen modulatorischen Funktionen des Slack-Kanals im Rahmen der Neuronenaktivität ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen im Slack-Gen zu einer Vielzahl pathologischer Zustände führen. Auf diese soll in den nachfolgenden Abschnitten genauer eingegangen werden.

## Neuropathische Schmerzen

Laut der Definition der IASP (*international association for the study of pain*) ist Schmerz „ein unangenehmes heftiges Sinnes- und Gefühlserlebnis, dass mit tatsächlichen oder möglichen Gewebeschäden verbunden ist oder in solchen Kategorien beschrieben wird“ (International Association for the Study of Pain 2018). Die Wahrnehmung von Schmerzen beinhaltet eine subjektive Komponente und wird durch ein Wechselspiel an biologischen, psychischen und sozialen Faktoren bestimmt (Turk und Okifuji 2002, Linton und Shaw 2011). Während der akute Schmerz infolge eines noxischen Stimulus eine Warnfunktion für den Organismus besitzt, stellen andauernde, chronische Schmerzen ein eigenes, sehr komplexes Krankheitsbild dar (Coderre et al. 1993). Der Begriff Nozizeption beschreibt die objektiven neuronalen Vorgänge, die im Verlauf der Schmerzwahrnehmung eine Rolle spielen. Infolge thermischer, mechanischer oder chemischer Stimulation kommt es zur Aktivierung der sogenannten Nozizeptoren, d. h. freien Nervenendigungen spezifischer, sensorischer Neurone des peripheren Nervensystems. Diese afferenten Neurone haben ihren Ursprung in den Spinalganglien (*dorsal root ganglia* (DRGs)). Ihre dünn myelinisierten ( $\alpha$ -Fasern) sowie nicht myelinisierten (C-Fasern) Axone führen bis ins Hinterhorn des Rückenmarks. Dort

kommt es an den synaptischen Endigungen der präsynaptischen Neurone zur Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern, wie beispielsweise Glutamat. Diese aktivieren dann nachgeschaltete Rückenmarksneurone, die die Information zum Thalamus weiterleiten. Die spino-thalamo-kortikalen Bahnen führen letztendlich zur Innervierung bestimmter Cortexareale, wodurch es zur bewussten Wahrnehmung der Schmerzen kommt. Durch Aktivierung des limbischen Systems erfolgt nachfolgend die emotionale Bewertung der Schmerzen. Neben den exzitatorischen Neuronen kommt es auch zur Aktivierung inhibitorischer Interneurone, welche die Nozizeption modulieren (Dubin und Patapoutian 2010). Das Hinterhorn stellt eine Art Filterfunktion dar, welches Millionen an peripheren Signalen erhält, diese sortiert und anschließend an supraspinale Stellen weiterleitet, die dann die Schmerzantwort bestimmen. Infolge von Gewebeerletzungen, Entzündungen (Entzündungsschmerz) oder Verletzungen des peripheren und zentralen Nervensystems (neuropathischer Schmerz) kommt es zur Hypererregbarkeit des nozizeptiven Systems (Basbaum et al. 2009, Schmidtke et al. 2009, Dubin und Patapoutian 2010). Diese Sensibilisierung führt zu einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit, wodurch geringfügige, nicht noxische Reize als Schmerz wahrgenommen werden (Allodynie). Auch kommt es zum gesteigerten Empfinden von Schmerzreizen (Hyperalgesie). Zudem kann Schmerz ohne jegliche Koinzidenz zu einem Reiz auftreten, oder bestehen bleiben nachdem die ursprüngliche Schmerzursache, beispielsweise eine periphere Gewebsverletzung, bereits ausgeheilt ist (Coderre et al. 1993). Daneben können Hypästhesien (herabgesetzte Schmerzempfindung) und Parästhesien (spontane Missempfindungen) auftreten (Coderre et al. 1993). Ursache für die gesteigerte Schmerzempfindlichkeit ist die Schädigung sensorischer Neurone und die damit verbundene Veränderungen in der Expression sowie der Aktivität diverser Ionenkanäle, was in einer gesteigerten Erregbarkeit der Neurone resultiert. Aufgrund der Expression von Slack in sensorischen DRG-Neuronen, sowie den Ergebnissen elektrophysiologischer Studien, welche eine Slack-assoziierte Regulation der Aktionspotentialfrequenz für diese DRG-Neurone gezeigt haben, wird Slack eine Beteiligung an der Weiterleitung von Schmerzen zugeschrieben (Tamsett et al. 2009, Nuwer et al. 2010, Huang et al. 2013). Vergleichende *in vivo* Studien an WT und Slack-KO Mäusen liefern Evidenzen, dass Slack einen Einfluss auf die Verarbeitung neuropathischer Schmerzen hat. In zwei Modellen zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen zeigten sowohl globale als auch DRG-Neuronen spezifische Slack-KO Mäuse ein gesteigertes neuropathisches Schmerzempfinden (Lu et al. 2015). Zudem konnte durch die gezielte Aktivierung von Slack-Kanälen mittels Loxapin in geringer Dosierung die Schmerzempfindlichkeit der WT Mäuse weiter reduziert werden. Im Gegensatz dazu hat die Aktivierung von Slack-Kanälen keinen Einfluss auf die akute Schmerzwahrnehmung infolge mechanischer oder thermischer Noxen sowie die Intensität von Entzündungsschmerzen. Ein Faktor, der im Rahmen der Entstehung

neuropathischer Schmerzen zur Sensibilisierung und Aktivierung der Slack-Kanäle beitragen könnte, ist der metabolische Co-Faktor  $\text{NAD}^+$ . So wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion zwischen  $\text{NAD}^+$  und Slack die Aktivität des Kanals positiv beeinflussen kann (Tamsett et al. 2009).  $\text{NAD}^+$ , welches infolge neuronaler Schädigung vermehrt gebildet wird, soll neben seinen metabolischen auch neuroprotektive Funktionen haben (Wang et al. 2005, Sasaki et al. 2006, Tamsett et al. 2009). Die Störungen der neuronalen Funktion von DRG-Neurone infolge neuronaler Schädigung durch Verletzungen oder Diabetes geht mit der Reduktion der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration einher (Ido 2007, Sharma et al. 2008, Tamsett et al. 2009). Zudem zeigen die Ergebnisse von Pabbidi et al., dass die Applikation des  $\text{NAD}^+$ -verbrauchenden Agens Streptozotocin eine direkte toxische Wirkung auf sensorische Neurone hat und in einer thermalen Hyperalgesie der behandelten Mäuse resultiert (Pabbidi et al. 2008). Ein weiterer Modulator der Slack-Kanäle ist TMEM16C (ANO3). Durch die Interaktion von TMEM16C und Slack wird die Sensitivität der Kanäle gegenüber  $\text{Na}^+$ -Ionen erhöht und die Einzelkanalleitfähigkeit gesteigert. Darüber hinaus wurde in IB4-positiven, nicht-peptidergischen Nozizeptoren der DRG-Neurone die Co-Expression von TMEM16C und Slack festgestellt. Dies stellt ein weiteres Indiz für die Beteiligung der Kanäle an der Schmerzentstehung dar. Studien mit TMEM16C-KO Ratten zeigen zudem, dass diese unter Basalbedingungen eine gesteigerte thermische und mechanische Schmerzempfindlichkeit aufweisen. Der siRNA-induzierte *Knockdown* von Slack in DRG-Neuronen von Ratten führt ebenfalls zu einer verminderten Schmerzschwelle der Tiere auf thermische und mechanische Reize. Diese Befunde implizieren, dass TMEM16C über die Modulation der Slack-Aktivität, die Erregbarkeit von DRG-Neuronen vermindert und damit Einfluss auf die Erregungsweiterleitung und Nozizeption nimmt (Huang et al. 2013).

## Epilepsie

Laut WHO sind weltweit etwa 50 Millionen Menschen an einer Form der Epilepsie erkrankt (World Health Organization 2018). Sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern können isolierte Anfälle, bei denen es zu abnormen, synchronen Entladungen der Neurone kommt, auftreten. Diese müssen von den eigentlichen Epilepsien, im Verlauf derer es wiederholt zu solchen epileptischen Anfällen kommt, abgegrenzt werden. Bis 2013 waren bereits mehr als 30 verschiedene Formen an Epilepsien bekannt. Diese unterscheiden sich in ihrer Epidemiologie sowie den daraus resultierenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen (Kim und Kaczmarek 2014). Bei einigen Epilepsieformen handelt es sich um sogenannte *Channelopathien*, also Erkrankungen deren Ursache eine Mutation verschiedener Kanalproteine ist. Durch die Genomsequenzierung von Epilepsiepatienten konnten eine Vielzahl an Gen-Mutationen identifiziert werden, die ligandgesteuerte Rezeptoren oder Ionenkanäle betreffen (Steinlein et al. 1995, Brenner et al. 2005, Kim und Kaczmarek 2014,

Tang et al. 2016). So wurden in den vergangenen Jahren in zahlreichen Patienten, die an schweren, pharmakologisch therapieresistenden Formen von Epilepsien leiden, Mutationen im Slack codierenden *KCNT1*-Gen gefunden. Stand Februar 2018 sind ca. 30 verschiedene, epilepsieassoziierte *KCNT1*-Mutationen bekannt (Lim et al. 2016, Hansen et al. 2017, Kawasaki et al. 2017, McTague et al. 2018). Bei all diesen Mutationen handelt es sich um *missense* Mutationen, die vor allem die funktionellen Bereiche des C-Terminus, wie beispielsweise die beiden RCK-Domänen sowie die NAD<sup>+</sup>-Bindungsstelle betreffen. Zudem wurden Mutationen in den S5 und S6 Domänen, welche die Porenregion flankieren, gefunden (Ishii et al. 2013). Die Häufung von Mutationen in Bereichen die für die Aktivierung sowie das *Gating* von Slack verantwortlich sind, führt zur Annahme, dass diese einen Einfluss auf die Kanalaktivität haben. Die meisten Epilepsieformen die in Zusammenhang mit einer Slack-Mutation stehen, sind Epilepsien mit frühem Krankheitsbeginn, sogenannte infantile epileptische Enzephalopathien (*early onset epileptic encephalopathies* (EOEE)). Zudem zeigen die Patienten häufig schwerere intellektuelle Beeinträchtigungen sowie Entwicklungsdefizite. Beispiele hierfür sind die *Malignant migrating partial seizures in infancy* (MMPSI) (Coppola et al. 1995), auch *Epilepsy of infancy with migrating focal seizure* (EIMFS) genannt, und das *Ohtahara syndrome* (OS) (Ohtahara et al. 1976). Aufgrund der epileptischen Aktivität kommt es bei den Betroffenen zu ausgeprägten Hirnfunktionsstörungen, welche zu schweren Behinderungen und Entwicklungseinschränkungen führen (Kim und Kaczmarek 2014). Zudem konnten Slack-Mutationen in Patienten, die an einer *Autosomal dominant nocturnal front lobe epilepsy* (ADNFLE) leiden nachgewiesen werden (Aminkeng 2012, Barcia et al. 2012, Heron et al. 2012, Ishii et al. 2013, Kim und Kaczmarek 2014, Martin et al. 2014). MMPSI ist eine Form der Säuglingsepilepsie, bei der es zu wandernden fokalen Anfällen kommt, die ihren Ursprung jeweils in unterschiedlichen Hirnarealen haben können. Die Erkrankung manifestiert sich meist innerhalb der ersten Lebenswochen, wobei zunächst nur vereinzelte fokale Anfälle auftreten, welche sekundär generalisieren können. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einem Anstieg der Anfallsfrequenz, dem Auftreten von Hirnschäden sowie der progressiven Verschlechterung der psychomotorischen Fähigkeiten (Coppola et al. 1995, Aminkeng 2012, De Filippo et al. 2013, Kim und Kaczmarek 2014). Bei dieser Form der Epilepsie besteht aufgrund der Resistenz gegenüber bekannten Antikonvulsiva keine adäquate Form der Behandlung (Bearden et al. 2014). Durch genetische Untersuchungen der Patienten konnten eine Vielzahl kausaler Mutationen in unterschiedlichen Genen identifiziert werden. In 39 % der untersuchten MMPSI Patienten wurde jedoch eine *KCNT1*-Mutation nachgewiesen (Lim et al. 2016) (Aminkeng 2012, Barcia et al. 2012, Ishii et al. 2013, McTague et al. 2013). Somit stellen Slack-Mutationen die häufigsten MMPSI verursachenden genetischen



Mutationen dar. Zudem treten im Rahmen dieser Erkrankung vor allem Mutationen im *SCN1A*-Gen ( $\text{Na}_v1.1$ ) (Carranza Rojo et al. 2011) und *TBC1D24*-Gen (Milh et al. 2013) auf. In genetischen Screenings konnte zudem, wie bereits oben erwähnt, ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *KCNT1* Mutationen und der ADNFLE festgestellt werden (Heron et al. 2012, Kim et al. 2014, Møller et al. 2015). ADNFLE ist eine fokale Epilepsieform, bei der es vor allem nachts zum Auftreten epileptischer Anfälle kommt. Der Erkrankungsbeginn liegt meist in der späten Kindheit. Seit längerer Zeit war der Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer Mutation im *CHRNA4*-Gen, welches für die  $\alpha 4$ -Untereinheit des neuronal exprimierten nikotinischen Acetylcholinrezeptors kodiert, bekannt (Steinlein et al. 1995). Des Weiteren wurden kausale Mutationen im *SCN2A*- und *KCNQ2*-Gen ( $\text{Na}_v2.1$  und  $\text{K}_v7.2$ ) identifiziert. Interessanterweise unterscheidet sich das Krankheitsbild der Patienten mit *KCNT1*-Mutation von dem der Träger anderer Mutationen. So kommt es bei ADNFLE Patienten mit Slack-Mutation häufig zur intellektuellen Beeinträchtigung und dem Auftreten anderer psychischer Erkrankungen, während Betroffene ohne Slack-Mutation kaum Beeinträchtigungen der Intelligenz und anderen neurologischen Funktionen zeigen (Kim et al. 2014, Møller et al. 2015).

Um herauszufinden zu welchen funktionellen Veränderungen von Slack die *KCNT1*-Mutationen beitragen und den ätiologischen Zusammenhang zwischen den einzelnen Slack-Kanalmutationen und den verschiedenen Epilepsieformen aufzuklären, wurden elektrophysiologische *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. In WT-Slack bzw. Mutanten-Slack exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten und HEK 293-Zellen konnte eine gesteigerte Aktivität der mutierten Slack-Kanäle im Vergleich zu WT-Slack-Kanälen nachgewiesen werden. Es wurden größere Slack-Ströme gemessen, wobei die Amplitude des Spitzenstroms der Slack-Mutanten gegenüber dem WT-Strom um das 3- bis 12-fache erhöht war (Barcia et al. 2012, Kim und Kaczmarek 2014, Martin et al. 2014, Milligan et al. 2014). Dieser Befund lässt sich nur teilweise durch eine gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit der mutierten Slack-Kanäle erklären (Barcia et al. 2012, Tang et al. 2016). Entsprechend ist eine Verminderung der Zwischenleitfähigkeiten sowie eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Sensitivität zu beobachten (Joiner et al. 1998, Barcia et al. 2012, Tang et al. 2016).

Der Zusammenhang zwischen der gesteigerten Slack-Kanalaktivität und der Entstehung epileptischer Anfälle konnte bis dato noch nicht abschließend geklärt. Es existiert jedoch die Hypothese, dass die gesteigerte Slack-Kanalaktivität für die bei EOEE Patienten identifizierten neuronalen Netzwerkveränderungen und die damit verbundene gesteigerte neuronale Erregbarkeit verantwortlich ist. In der Regel sind die Amplitude und Dauer eines Aktionspotentials, welche durch die De- und Repolarisation der Zellmembran bestimmt werden, fundamental für die Neuronenaktivität innerhalb des Nervensystems. Durch Freisetzung exzitatorischer bzw. inhibitorischer Neurotransmitter, wie Glutamat bzw. GABA,

und die Bindung dieser Botenstoffe an ihre postsynaptischen Rezeptoren kommt es zur Auslösung von Aktionspotentialen und somit zur gezielten Erregung bzw. Inhibierung bestimmter Neurone. Während eines epileptischen Anfalls hingegen kommt es zu einer exzessiven und abnormen Erregung kortikaler Neurone. Im Rahmen der Pathophysiologie der Epilepsie könnte die gesteigerte Aktivität der Slack-K<sup>+</sup>-Kanäle einerseits zu einer größeren K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit und dadurch zu einer schnelleren Repolarisation und einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer führen. Dies könnte nachfolgend indirekt zu einer vermehrten elektrischen Erregbarkeit der Neurone beitragen, da die Geschwindigkeit mit der spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Kanäle regenerieren und somit wieder aktivierbar sind zunimmt. Andererseits könnte der gesteigerte K<sup>+</sup>-Ionenausstrom durch Slack-Kanäle zu einer verlängerten Hyperpolarisation der Zelle führen. Dadurch würde es zur Potenzierung hyperpolarisationsaktivierter Kationenkanalströme (HCN-Ströme,  $I_h$ ) kommen, was ebenfalls zur gesteigerten neuronalen Erregbarkeit beiträgt. Eine weitere Hypothese wie die Slack-Kanalüberaktivität an den spontanen Neuronenentladungen während epileptischer Anfälle beteiligt ist, stellt die selektive K<sup>+</sup>-Kanalüberaktivität inhibitorischer Interneurone dar. Dabei käme es unter physiologischen Bedingungen, infolge der K<sup>+</sup>-getriggerten anhaltenden Hyperpolarisation, zur Unterdrückung der inhibitorischen Neuronenaktivität. Dies würde nachfolgend zur Dissbalance zwischen Exzitation und Inhibition führen (Tang et al. 2016). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die gesteigerte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit der mutierten Slack-Kanäle im Verlauf der frühen Phase der neuronalen Entwicklung die Formation neuronaler synaptischer Kontakte moduliert und dadurch eine Prädisposition des Nervensystems zur Entwicklung von Fehlschaltungen, die dann zu epileptischen Entladungen führen, schafft (Kim und Kaczmarek 2014).

Aufgrund des postulierten Zusammenhangs zwischen der Slack-Kanalüberaktivität und der Entwicklung epileptischer Anfälle, wurden therapeutische Ansätze untersucht, deren Ziel es ist den verstärkten K<sup>+</sup>-Strom zu minimieren. Chinidin, ein zugelassenes Antiarrhythmikum, ist ein Na<sup>+</sup>-Kanal blockierendes Agens, welches eine partial antagonistische Wirkung an Slack-Kanälen aufweist. *In vitro* Studien konnten bereits vor einigen Jahren zeigen, dass Chinidin sowohl WT- als auch mutierte Slack-Kanäle blockiert (Milligan et al. 2014). Im Rahmen einer Studie wurde die therapeutische Wirkung von Chinidin an einer 3-jährigen Patientin mit MMPSI untersucht. Dabei kam es in Folge der Chinidingabe zur periodischen Anfallsfreiheit bzw. zu einer deutlichen Reduktion der Anfallsfrequenz, sowie der Verbesserung der psychomotorischen Entwicklung (Bearden et al. 2014). Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie, ebenfalls an einem MMPSI Patienten, bestätigt werden (Mikati et al. 2015). Das gezielte pharmakologische *Targeting* mutierter Kanäle stellt somit einen bedeutenden Ansatz zur Therapie behandlungsresistenten Epilepsien dar.

## Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)

Das sogenannte Fragile X Syndrom (FXS) ist die häufigste genetisch bedingte Form kognitiver Behinderung (Oostra und Willemsen 2003, Bear et al. 2004, Zhang et al. 2012). Neben der deutlich ausgeprägten Intelligenzminderung zeigen die Betroffenen u. a. autistische Symptome, Lernschwächen und Sprachstörungen, Verzögerungen der geistigen und motorischen Entwicklung, sowie Hyperaktivität und Aggressivität (O'Donnell und Warren 2002, Belmonte und Bourgeron 2006). Interessanterweise wird bei den Betroffenen auch das Auftreten epileptischer Anfälle beobachtet (Berry-Kravis 2002). Darüber hinaus treten im Rahmen der Erkrankung häufig Anomalien der Gesichtsform, Hodenvergrößerungen sowie gelegentlich Wirbelsäulen- und Fußdeformationen auf (Ashley et al. 1993). Ursächlich für die Erkrankung ist eine X-chromosomale *Loss-of-function*-Mutation des *FMR1*-Gens (Bassell und Warren 2008). Dabei kommt es im Bereich der 5' UTR (*untranslated region*) zur Expansion des Basentriplets CGG. Bei dieser Mutation handelt es sich um die erste nachgewiesene *Trinukleotid-repeat-expansions*-Mutation. Normalerweise kommt es zu 5 bis 55 solcher CGG Wiederholungen (*repeats*), die durchschnittliche Länge der Sequenz beträgt 30 Einheiten. Bei einer voll ausgeprägte Mutation (*full mutation* (FM)) in FXS-Patienten enthält die Sequenz mehr als 200 CGG-*Repeats* (Fu et al. 1991), welche zudem hypermethyliert werden (Verkerk et al. 1991, Bassell und Warren 2008, Oostra und Willemsen 2009, Willemsen et al. 2011). Diese Hypermethylierung kann sich bis zur Promotorregion erstrecken, was zum transkriptionellen *Silencing* des *Fragile X mental retardation 1* Proteins (FMRP) führt. Das FMR1-Protein besitzt eine für hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) Proteine typische Struktur (Feng et al. 1997). Neben den drei RNA-Bindedomänen (zwei Ribonukleoprotein-K-Homologie Domänen (KH Domänen) und einem *Cluster* aus Arginin- und Glycin-Resten (*RGG box*), enthält das Protein eine Nucleus-Lokalisation-Signalsequenz (NLS) und eine Nucleus-Export-Signalsequenz (NES) (Eberhart et al. 1996, Bardoni et al. 1997, Oostra und Willemsen 2009). FMRP wird im ganzen Körper ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert. Besonders große Expressionslevel konnten im Gehirn und dort vor allem in Neuronen festgestellt werden, wo FMRP an zahlreichen prä- und postsynaptischen Prozessen beteiligt ist (Christie et al. 2009). Zudem wird das Protein v. a. in den Spermatogonien der Hoden exprimiert, wodurch die bei FXS-Patienten teilweise beobachteten Hodenvergrößerungen erklärt werden können. Subzellulär ist FMRP hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert. So wurden im Cytosol der Somata, aber auch an der Basis von Dendriten, sowie in dendritischen *Spines* große Mengen an FMRP nachgewiesen. Dabei liegt FMRP als Teil eines Ribonukleoproteinkomplex vor und bindet über mRNA an freie oder ER-assoziierte (Poly)ribosomen (Schaeffer et al. 2001). Zudem wurden geringe Mengen an FMRP im Nucleus der Neurone detektiert. Dies erklärt sich dadurch, dass FMRP zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma zirkuliert. Es ist bekannt,

dass FMRP eine entscheidende Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielt. So ist das Protein an allen, der Transkription nachgeschalteten Schritten, wie dem Export der mRNA aus dem Zellkern ins Cytosol, der Stabilisation und dem cytoplasmatischen Transport der mRNA, sowie der Kontrolle der mRNA-Translation beteiligt (Khandjian et al. 2004). Dabei ermöglicht die NLS des Proteins das Einschleusen von FMRP in den Zellkern, wo es als mRNA-Bindungsprotein in der Lage ist verschiedene RNA-Transkripte zu binden (Eberhart et al. 1996). Nachfolgend wird der Komplex aus FMRP und mRNA mit Hilfe der NES wieder in das Cytosol transportiert. Neben der Bindung nukleärer mRNA kann FMRP an bereits ins Cytosol freigegebene mRNA binden. Durch seine mRNA-Bindungseigenschaft nimmt FMRP regulatorischen Einfluss auf die dendritische Proteinsynthese, indem es die Translation der gebundenen mRNA unterdrückt (Feng et al. 1997, Khandjian et al. 2004, Stefani et al. 2004). In neuronalen Zellen ist FMRP zudem an der mRNA-Lokalisation beteiligt. Durch Bindung des Motorproteins KIF3C wird der Transfer der mRNA vom Soma zum Zielort, wie beispielsweise den neuronalen Dendriten, ermöglicht. Dort kommt es zur Assoziation des mRNP-Komplexes mit den Ribosomen-Untereinheiten (Khandjian et al. 1996, Mazroui et al. 2002, Antar und Bassell 2003, Khandjian et al. 2004) wobei FMRP in mRNA-abhängiger Weise an Ribosomen und Polysomen bindet (Siomi et al. 1996, Corbin et al. 1997). Infolge neuronaler Aktivität dissoziiert FMRP dann vom RNP-Komplex und erlaubt so die Translation der mRNA an den Ribosomen (Huber et al. 2002, Chen et al. 2014). Diese aktivitätsabhängige Induktion der Proteinsynthese in synaptosomalen Regionen bewirkt eine bedarfsabhängige Synthese von Proteinen, die v. a. im Rahmen der neuronalen Plastizität und der LTD von Bedeutung sind (Bassell und Warren 2008). So kommt es beispielsweise durch die Aktivierung von mGluR1 zu einem gesteigerten Transport der FMRP-mRNP in die Dendriten und führt dort zum Einbau von AMPA-Rezeptoren in die Plasmamembran (Li et al. 2002, Antar et al. 2004, Nakamoto et al. 2007). Co-Immunopräzipitationsstudien mit synaptosomalen Lysaten aus verschiedenen Hirnregionen von Mäusen bzw. isolierten BC-Neuronen des kalifornischen Seehasen (*aphysia californica*) offenbarten eine direkte Interaktion von FMRP mit dem Carboxy-Terminus von Slack (Brown et al. 2010, Zhang et al. 2012). Infolge der Bindung von FMRP kommt es zur Aktivierung des Kanals. In vergleichenden elektrophysiologischen Untersuchungen an MNTB-Neuronen von WT und FMRP-defizienten (*Fmr1<sup>-/-</sup>*) Hirnschnitten wurden in den FMRP-KO Neuronen geringere  $I_{KNa}$ -Ströme als in den WT Neuronen gemessen, obgleich die Anzahl exprimierter Slack-Kanäle nicht reduziert war (Brown et al. 2010). Die Injektion von FMRP in BC-Neurone führte darüber hinaus zu einem Anstieg des  $K_{Na}$ -Ionenstroms, sowie zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und der Membranhyperpolarisation (Zhang et al. 2012). Neben der Aktivierung der Slack- $K^+$ -Kanälen wurde eine Interaktion von FMRP mit der  $\beta 4$ -Untereinheit des BK-Kanals sowie dem  $Ca_v2.2$

spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal nachgewiesen. Infolgedessen kommt es zu einer Regulation der Aktionspotentialdauer sowie der Freisetzung von Neurotransmittern (Deng et al. 2013, Ferron et al. 2014, Kim und Kaczmarek 2014, Ferron 2016). Zhang et al. postulieren, dass es durch die Interaktion von Slack und FMRP, z. B. im Rahmen hochfrequenter Neuronenaktivität, zur aktivitätsabhängigen Proteinsynthese kommt. So bewirkt der *Knockdown* der Slack-Kanäle in BC-Neuronen die gleiche charakteristische Veränderung neuronaler Aktivitätsmuster wie die Hemmung der Proteinsynthese durch Anisomycin. Demnach ist ein Einfluss von Slack auf die Aktivität von FMRP und dessen Regulation der aktivitätsabhängigen Proteinbiosynthese denkbar (Zhang et al. 2012).

### Hypomyelinisierung

Im Rahmen der Diagnostik eines EOEE Patienten wurde zusätzlich zu den Epilepsiesymptomen und schweren psychomotorischen Entwicklungseinschränkungen eine unzureichende sowie entwicklungsverzögerte Myelinisierung festgestellt. Dies stellt ein typisches Symptom für eine Leukoenzephalopathie dar, deren Ursache eine unvollständige Myelinisierung der Neurone ist. Durch *whole-exon sequencing* wurde bei diesem Patienten eine neue, noch unbekannt heterozygote *de novo* Mutation im *KCNT1*-Gen identifiziert (Vanderver et al. 2013). Dies lässt ein Zusammenhang zwischen der identifizierten *KCNT1*-Mutation und den organischen Veränderungen, die durch die Leukoenzephalopathien bedingt werden und v. a. die weiße Hirnsubstanz betreffen vermuten. Nachfolgend wurde in zwei Patienten mit hypomyelinisierenden Leukodystrophien zwei weitere bereits bekannte *KCNT1*-Mutationen nachgewiesen (Arai-Ichinoi et al. 2015, 2016). Diese Befunde verstärken die Annahme, dass *KCNT1*-Mutationen mit einer Myelinisierungsstörung in Verbindung stehen könnten. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass es sich bei der von Vanderver et al. identifizierten *KCNT1*-Mutation des Leukoenzephalopathie-Patienten um die erste nachgewiesene *loss-of function* Mutation von Slack handelt (Evely et al. 2017).

#### 1.5.4 Bisheriger Kenntnisstand bezüglich des Zusammenhangs von Slack und exzitotoxischer Schädigung

Bislang konnte noch kein direkter Zusammenhang zwischen ischämischen bzw. neurotoxischen Zuständen und der Slack-Kanalaktivität nachgewiesen werden. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass es nach AMPA-Rezeptoraktivierung zu einem messbaren Efflux an  $\text{K}^+$ -Ionen kommt, der durch Substitution von  $\text{Na}^+$  mit  $\text{Li}^+$  vollständig aufgehoben werden kann. Zudem zeigt dieser  $\text{K}^+$ -Ionenausstrom für Slack charakteristische Eigenschaften gegenüber verschiedenen modulatorischen Einflüssen. So kann durch die Zugabe von Chinidin eine vollständige Blockade des AMPA-induzierten  $\text{K}^+$ -Auswärtsstroms erzielt werden. Darüber hinaus ist keine Änderung der Leitfähigkeit durch die Applikation von

Cl<sup>-</sup>-Ionen bzw. ATP nachweisbar (Nanou und El Manira 2007). Auch konnte in Co-Immunopräzipitationsstudien synaptosomaler Rattengehirnfraktionen sowie ZNS-Lysaten des Neunauges eine Co-Lokalisation von Slack mit AMPA-Rezeptoren nachgewiesen werden. Elektrophysiologische Untersuchungen implizieren außerdem, dass der AMPA-vermittelte K<sup>+</sup>-Efflux als negativer *Feedback*-Mechanismus zur Reduktion der exzitatorischen synaptischen Transmission beiträgt (Nanou et al. 2008). Eine andere Arbeitsgruppe konnte in einer Studie an *Locus caeruleus*-Neuronen die Aktivierung von K<sub>Na</sub>-Strömen nach AMPA-Rezeptorstimulation bestätigen. So kommt es nach Glutamat-induzierter Aktivierung dieser Neurone zu einem *Burst* an Aktionspotentialen gefolgt von einer 30 - 45 s andauernden Inhibierung der Neuronenaktivität. Diese Inhibierungsphase neuronaler Aktivität wird durch einen K<sup>+</sup>-Ionenefflux getriggert der selektiv durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren hervorgerufen und andererseits durch den AMPA-Rezeptorantagonisten Cyanquixalin (CNQX) reduziert werden kann. Interessanterweise führt die Reduktion der extrazellulären Na<sup>+</sup>-Ionenkonzentration zur Abschwächung und die Gabe des K<sub>Na</sub>-Aktivators Bithionol zur Steigerung der Inhibierung der Neuronenaktivität (Zamalloa et al. 2009). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse stark auf eine Slack-abhängige Neuroprotektion während hochfrequenter Neuronenaktivität hin, wie sie auch im Rahmen exzitotoxischer Prozesse vorkommt.

Des Weiteren konnte durch die Co-Expression von G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren und Slo2-Kanälen in *Xenopus* Oozyten ein modulatorischer Effekt dieser Rezeptoren auf die Kanalaktivität nachgewiesen werden. So führt die Stimulation von mGlu1-Rezeptoren zur Aktivierung benachbarter Slack-Kanäle und dem damit verbundenen Anstieg der Slack-Ionenströme. Im Gegensatz dazu kommt es infolge der mGlu1-Stimulation zur Inhibierung der Slick-Kanalaktivität. Ursächlich für diese gegensätzliche Regulation der beiden Slo2-Kanäle durch mGluR1 ist ihre unterschiedliche Reaktion auf die mGluR1-vermittelte Phosphorylierung des jeweiligen C-terminalen Endes der Kanäle durch die PKC. So kann infolge der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)-induzierten Aktivierung der PKC und nachfolgender Phosphorylierung von Slick und Slack eine Inhibierung von Slick-Strömen sowie ein Anstieg von Slack-Strömen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit die Co-Expression von Slack-Kanälen mit G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren in hippocampalen sowie kortikalen Gehirnregionen nachgewiesen werden (Santi et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass es infolge der mGluR1-vermittelten Aktivierung von Slack-Kanälen zu einem ähnlichen *Feedback*-Mechanismus wie nach AMPA-Rezeptorstimulation kommt.

## Möglicher Zusammenhang zwischen der Slack-Aktivität und neuroprotektiven Mechanismen im Rahmen ischämischer/hypoxischer Zustände

Exzitotoxizität spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen neurodegenerativer Prozesse während z. B. cerebraler Ischämie bzw. hypoxischen Zuständen. Bei der cerebralen Ischämie kommt es zu einer Minderdurchblutung bestimmter Hirnareale und somit zu einer verminderten Versorgung dieser Abschnitte mit Glukose und Sauerstoff ( $O_2$ ). Als Hypoxie bezeichnet man die Unterversorgung von Gewebe mit Sauerstoff. Ursächlich dafür ist die Verengung afferenter Gefäße und die dadurch bedingte verminderte Durchblutung nachfolgender Areale. Infolge dieser Zustände kommt es häufig zum Zelluntergang mit nachhaltiger Schädigung des Gewebes. So führt die verminderte Gewebepfusion zur Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks ( $pO_2$ ) und zur Anreicherung von  $CO_2$  in den Zellen, wodurch sich eine anaerobe Stoffwechsellage ergibt. Dies bedingt die respiratorische Azidose und nachfolgend die Laktatazidose der Zelle, was durch  $H^+$ -Akkumulation zum Abfall des intrazellulären pH-Werts führt (Kaczmarek 2013). Um der Abnahme des pH-Werts entgegenzuwirken, werden Protektionsmechanismen aktiviert, die jedoch langfristig zum Zelltod führen können. Einer dieser Regulationsmechanismen zur Reduktion der intrazellulären  $H^+$ -Ionenkonzentration  $[H^+]_i$  ist die Aktivitätssteigerung des  $Na^+/H^+$ -Austauschers, was die Akkumulation von  $[Na^+]_i$  zur Folge hat (ten Hove et al. 2007). Zudem kommt es mit abnehmendem Energiegehalt der Zelle, bedingt durch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und ATP-Depletion (Kameyama et al. 1984) zur Abnahme der  $Na^+/K^+$ -ATPase Aktivität und somit zu einem weiteren Anstieg der  $[Na^+]_i$ . Die Zunahme der  $[Na^+]_i$  führt zur Depolarisation der Membran und somit zur Öffnung spannungsabhängiger  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Dadurch nimmt die  $[Na^+]_i$  sowie  $[Ca^{2+}]_i$  weiter zu. Die hohe  $[Na^+]_i$  bewirkt schließlich die Umkehr der Flussrichtung des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers, wodurch dieser  $Na^+$ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten vom Zellinneren in den Extrazellularraum transportiert. Im Gegenzug gelangen weitere  $Ca^{2+}$ -Ionen in das Innere der Zelle, was letztendlich zum Zelltod führt. Dieser Ionenentgleisung könnte die Aktivierung ionensensitiver  $K^+$ -Kanäle entgegenwirken. So ist durchaus denkbar, dass es infolge des  $[Na^+]_i$ -Anstiegs zur gesteigerten Offenwahrscheinlichkeit von  $K_{Na}$ -Kanälen, wie beispielsweise dem Slack-Kanal kommt. Der dadurch bedingte gesteigerte  $K^+$ -Ausstrom aus der Zelle sowie die nachfolgend anhaltenden Hyperpolarisation der Membran könnten zur Stabilisation des Membranpotentials beitragen (Kaczmarek 2013). Eine solche protektive Slack-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen wurde zunächst kontrovers diskutiert. So deuten die Daten der Arbeitsgruppe um Ruffin et al. einerseits daraufhin, dass es infolge der Reduktion des pH-Werts und dem Anstieg von  $CO_2$  zu einer Abnahme der Slack-Aktivität kommt. Allerdings wurden diese Messungen unter physiologischen  $Na^+$ -Ionenkonzentrationen durchgeführt. Versuche mit einer erhöhten Konzentration an

Na<sup>+</sup>-Ionen, wie unter ischämischen Bedingungen üblich, zeigten hingegen eine gesteigerte Aktivität von Slack (Ruffin et al. 2008). Diese Befunde lassen vermuten, dass die pH-Sensitivität des Slack-Kanals abhängig von der Na<sup>+</sup>-Ionenkonzentration ist und dass Slack unter ischämischen Bedingungen aktivierbar ist. Der direkte Nachweis der protektiven Funktion von Slack unter ischämischen *ex vivo* und *in vivo* Bedingungen steht allerdings noch aus.

## 1.6 Cerebelläre Granularzellen (CGCs)

Die Granularzellen des Cerebellums, welche auch als Körnerzellen bezeichnet werden, stellen die größte Neuronenpopulation des Säugetiergehirns dar. Das Cerebellum selbst ist eine sehr prominente Gehirnregion und mehr als 90 % der cerebellären Neurone sind Granularzellen (Contestabile 2002). Beim Menschen beträgt der Anteil an Granularzellen im Vergleich zur gesamten Anzahl an Neurone im Gehirn mehr als 50 %. Der cerebelläre Cortex besteht aus drei Schichten, der Molekularschicht (*Stratum moleculare*), der Purkinjzellschicht (*Stratum purkinjense*) und der Granularzellschicht (*Stratum granulosum*). Diese enthalten verschiedene Neuronenzelltypen, wie die Purkinjzellen, Granularzellen, Golgi-Zellen, Lugaro-Zellen, Pale-Zellen (*unipolar brush cells* (UBCs)), Korbzellen und Sternzellen (Voogd und Glickstein 1998, Ramnani 2006, Cerminara et al. 2015). Funktionell gesehen sind die Purkinjzellen der bedeutendste Zelltyp des Cerebellums, da sie die einzige Ausgangspforte darstellen. Diese einschichtig angeordneten Neurone weisen einen charakteristischen, äußerst verzweigten Dendritenbaum auf, der in die Molekularzellschicht projiziert. Dort erhalten die Purkinjzellen Input von zwei glutamatergen exzitatorischen Neuronensystemen, den Kletterfasern der unteren Olive der *Medulla oblongata* und den Parallelfasern der Granularzellen, welche wiederum durch die Moosfasern aktiviert werden. Zudem empfangen die Purkinjzellen inhibitorische Afferenzen von zwei, in der Molekularzellschicht lokalisierten, GABAergen Interneurontypen, den Korbzellen und den Sternzellen. Darüber hinaus bilden sie in der Granularschicht inhibitorischen Synapsen mit den dort lokalisierten Interneuronen, den GABAergen Golgi-Zellen und den Lugaro-Zellen, aus. Die Axone der Purkinjzellen ziehen bis in die cerebellären Kerngebiete, welche tief in der weißen Substanz lokalisiert sind. Dort kommt es an der präsynaptischen Membran der Purkinjzellen zur Ausschüttung von GABA, wodurch es zur Hemmung nachgeschalteter Neurone, die u. a. an der Kontrolle von Bewegungsabläufen beteiligt sind, kommt (Cerminara et al. 2015). Die Granularzellen, deren Zellkörper sich in der Granularzellschicht des cerebellären Cortexes befinden, verfügen über je drei bis vier kurze, unverzweigte Dendriten. Ihre unmyelinisierten Axone (Perge et al. 2012) ziehen bis in die Molekularschicht (siehe oben) der Kleinhirnrinde. Dort verzweigen sie sich T-förmig und bilden die sogenannten Parallelfasern aus. Diese bis zu 5 mm langen Fasern verlaufen parallel zur *Folia cerebelli* der



Kleinhirnrinde und befinden sich im rechten Winkel zu den Axonen der Purkinjezellen. Wie bereits erwähnt bilden die Parallelfasern sowie Axonal-lokalisierte Synapsen der Granularzellen synaptische Kontakte mit den Dornenfortsätzen der dicht verzweigten Dendritenbäume der Purkinjezellen aus. Zudem interagieren sie mit den Dendriten anderer kortikaler Interneurone. Granularzellen sind die einzigen exzitatorischen Neurone innerhalb des Cerebellums und setzen an ihren Synapsen Glutamat frei. Innerviert werden sie von den ebenfalls glutamatergen Moosfasern, die ihren Ursprung in Hirnstammkerngebieten und dem Rückenmark haben (Ruigrok 2011, Ruigrok et al. 2014).

### **1.6.1 CGCs als Modell zur Untersuchung von Zelltodmechanismen *in vitro***

Primäre cerebelläre Granularzellkulturen (CGC-Kulturen) sind ein bereits seit langer Zeit etabliertes und gut charakterisiertes Modellsystem zur Untersuchung diverser molekularer Zusammenhänge *in vitro*. Dabei können einerseits Mechanismen im Rahmen neuronaler Schädigung, wie beispielsweise der neuronalen Apoptose, aber auch Prozesse, die zur Neuroprotektion und der neuronalen Entwicklung beitragen untersucht werden (Contestabile 2002, Bilimoria und Bonni 2008, Krämer und Minichiello 2010). Vorteilhaft ist, dass CGC-Kulturen ein Zellkultursystem mit einer sehr homogenen Neuronenpopulation darstellen. Unter Standard-Kultivierungsbedingungen beträgt der Anteil an CGCs in solchen Kulturen mehr als 90 %. Zudem ist bekannt, dass sich die cerebellären Granularzellen in Nagetieren v. a. in den ersten beiden postnatalen Wochen aus Vorläuferzellen entwickeln (Manzini et al. 2006, Lee et al. 2009). Aufgrund dieser vorwiegend postnatalen Entwicklung können diese Neurone durch Präparation der Cerebelli postnataler Mäusen gewonnen werden und beginnen direkt nach dem Ausplattieren zu differenzieren (Lee et al. 2009). Die entwicklungspezifischen Veränderungen der CGC-Neurone in *in vitro* Systemen entsprechen dem Übergang unreifer zu ausgereiften Neuronen *in vivo* (Manzini et al. 2006). So erreichen die CGC-Neurone nach sieben Tagen in Kultur (*days in vitro*, DIV) einen ausgereiften Zustand (Cerminara et al. 2015). Wie in allen neuronalen Zellkultursystemen fehlen auch in diesem Modell die für das Gehirn typischen neuronalen Verschaltungen sowie die Interaktion verschiedener Neuronengruppen untereinander. So geht der *Input* der Moosfasern auf die cerebellären Granularzellen sowie die Verbindungen mit den Purkinjezellen im *in vitro* System verloren. Um dieses Problem so lösen wir die synaptische Aktivität durch die Zugabe depolarisierende Konzentrationen an Kaliumchlorid (KCl) nachgeahmt und so das neuronale Wachstum der CGCs in Kultur gewährleistet (Gallo et al. 1987, Franklin und Johnson 1992, Krämer und Minichiello 2010). Auch konnten durch den Einsatz primärer CGC-Kulturen bereits einige interessante Erkenntnisse bezüglich der neuronalen Apoptose sowie der Migration und Differenzierung der Neurone im ZNS gewonnen werden (Bilimoria und Bonni 2008). Aufgrund der vorbezeichneten Aspekte und

der bereits nachgewiesenen Expression von Slack in der Granularzellschicht des cerebellären Cortex (Bausch et al. 2015) stellt dieses System eine hervorragende Möglichkeit zur Überprüfung der Rolle von Slack während exzitotoxischer Bedingungen dar.

## 1.7 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Akute sowie chronische neurodegenerative Erkrankungen zählen zu den führenden Ursachen für Behinderung und Tod weltweit. Trotz unterschiedlicher Ätiologien spielen exzitotoxische neuronale Schädigungsmechanismen bei diesen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Exzitotoxizität ist eine spezifische Form neuronaler Schädigung, die durch die exzessive Stimulation von Glutamaterezeptoren hervorgerufen wird (Olney 1989). Trotz intensiver Forschung an exzitotoxischen Schädigungsmechanismen existieren noch keine effektiven Therapiestrategien um beispielsweise die exzitotoxische Neurodegeneration während eines Hirninfarktes zu limitieren. Auch therapeutische Ansätze die der Progression chronischer neurodegenerativer Erkrankungen entgegen wirken können sind klinisch nicht etabliert. NMDA-Rezeptorantagonisten (z. B. Licostinel und Selfotel) (Albers et al. 1999, Davis et al. 2000), die zur Reduktion der exzitotoxischen Überstimulation beitragen sollen, konnten in diesem Zusammenhang aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen, unzureichender Pharmakokinetik oder therapeutischer Dosen bislang nur wenig überzeugen (Ikonomidou und Turski 2002, Albensi et al. 2004, Lipton 2004). Die Modulation kaliumselektiver Ionenkanälen, die im Rahmen exzitotoxischer Schädigungsmechanismen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, stellt einen möglichen Ansatzpunkt für die gezielte Behandlung akuter sowie der progredienter Neurodegeneration bei Alzheimer, ALS und Epilepsie dar (Nwosu et al. 2010, Virgili et al. 2013, Bearden et al. 2014). So konnte im Mausmodell bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen der BK-Kanalaktivität und Neuroprotektion nachgewiesen werden (Kulawiak et al. 2008, Liao et al. 2010, Bentzen et al. 2014). Auch der ubiquitär neuronal exprimierte  $\text{Na}^+$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal Slack stellt ein wichtiger Regulator neuronaler Erregbarkeit dar. So wurde eine Beteiligung von Slack an Adaptionsprozessen, der langsamen Nachhyperpolarisation sowie dem rhythmischen Feuern bestimmter Neurone nachgewiesen (Kaczmarek 2013). Zudem weisen *in vitro* Studien daraufhin, dass Slack durch sehr  $[\text{Na}^+]_i$  aktiviert wird. Daher wurde bereits früh über eine mögliche Funktion des Kanals unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z. B. während ischämischer/hypoxischer Zustände die mit hohen  $[\text{Na}^+]_i$  einhergehen spekuliert (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005). Darüber hinaus wurde eine direkte Interaktion von Slack-Kanälen mit AMPA-/Kainat-Rezeptoren nachgewiesen (Nanou et al. 2008). So führt der AMPA-mediierte  $\text{Na}^+$ -Einstrom zur Aktivierung von Slack und dem dadurch vermittelten  $\text{K}^+$ -Ausstrom. Dies bedingt über einen negativen *Feedback*-Mechanismus die Reduktion der AMPA-induzierten exzitatorischen synaptischen Transmission (Hess et al. 2007, Nanou et al. 2008). Diese Befunde führen zu der Hypothese, dass Slack-Kanäle im Rahmen exzitotoxischer Schädigungsmechanismen aktiviert werden und durch den lang anhaltenden  $\text{K}^+$ -Ausstrom der Membrandepolarisation entgegenwirken. Dies wiederum könnte zur Reduktion der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ - und

Na<sup>+</sup>-Kanälen beitragen und somit die toxischen Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Überladung, welche letztlich ursächlich für den neuronalen Zelltod ist, vermindern. In diesem Zusammenhang war es das zentrale Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit die Rolle des endogenen Slack-Kanals für die Protektionsmechanismen im Rahmen neuronaler exzitotoxischer Schädigung aufzudecken. Hierfür wurden erstmals globale Slack-*Knockout* Mausmutanten direkt mit ihren WT-Wurfgeschwistern in einem *in vivo* Modell zur Induktion exzitotoxischer Schädigung untersucht. Basierend auf diesen Untersuchungen sollte auch geklärt werden ob eine pharmakologische Intervention mit dem Slack-Aktivator Loxapin den neuronalen Zelltod während exzitotoxischer Schädigung limitiert. Um die entsprechenden Zusammenhänge, sowie zugrundeliegenden Mechanismen der potentiellen Slack-vermittelten Neuroprotektion zu entschlüsseln wurde parallel ein *in vitro* Neuronen-Zellkultursystem etabliert. Durch die Stimulation kultivierter primärer Granularzellen mit Glutamat in Abhängigkeit von NMDA- und AMPA-Rezeptorantagonisten sollte der in der Eingangshypothese postulierte Zusammenhang zwischen Slack und den iGluRs bestätigt werden. Letztlich war es auch ein Ziel zu überprüfen, ob und inwiefern die Slack-Kanalaktivität einen Einfluss auf die [Ca<sup>2+</sup>]-Akkumulation nach iGluR-Rezeptorstimulation sowie Veränderungen in der Genexpression potentieller neuroprotektiver bzw. neurotoxischer Faktoren infolge der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität hat.

## 2 Material

Allgemeine Laborgeräte, Software und standardmäßig verwendete Verbrauchsmaterialien sind in Abschnitt 2.1 aufgeführt. Versuchsspezifische Materialien, Substanzen und Puffer sind im Abschnitt 2.2 tabellarisch aufgelistet.

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
Absaugpumpe (Zellkultur)	KNF Laborport, Neuberger
Analysenwaage	VWR-124, Sartorius AG
Autoklav	Systemec 3870 ELV, Systemec GmbH
Brutschrank (Zellkultur)	WTB, Binder HERAcell, Heraeus
Detektionssystem (Western Blot)	Amersham Imager 600, GE-Healthcare
Elektrodenplatten (Western Blot)	30034507, Scie-Plas
Elektrophoresekammer (Genotypisierung)	Sub-Cell, Bio-Rad
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Mini Protean, Bio-Rad
Fluoreszenzlampe (Ca <sup>2+</sup> -Messapparatur)	XBO 75, Carl Zeiss
Feinbohrschleifer FBS 240/E	28472, Proxxon
Gasbrenner	Gasprofi 1, Wartewig Labor- und Dentaltechnik
Geldokumentationsanlage	BioDoc Analyze, Biometra
Hamilton Spritze SYR 50µl	705N, Hamilton
Histologiescanner	Mirax Desk Scanner, Zeiss Panoramic Desc, 3D Histech
Isofluran Narkoseeinheit	0258-Narkoseeinheit, Völker GmbH
Kamera AxioCam MRc Rev.3	Carl Zeiss
Kamera Spot Inside (Ca <sup>2+</sup> -Messapparatur)	Visitron
Kleintierwaage	MS-400, G & G
Kryotom	Microm HM, Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf
Magnetische Heizplatte	Wilovert 30, Hund
Mikroplattenreader (ELISA-Reader)	Tecan Infinite F200 Pro, Tecan
Mikroskop	
- Zellkultur	Wilovert 30, Hund Wetzlar
- Durchlicht	Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss
- Fluoreszenz (Apotom)	Zeiss Axioimager Z1, Carl Zeiss
- Fluoreszenz (Ca <sup>2+</sup> -Messapparatur)	Zeiss Axiovert S100, Carl Zeiss
Mikrowelle	MWG 800 FiF
Multipipette	Handy StepS, Brand
PCR-Cycler	Mastercycler Gradient, Eppendorf
pH-Elektrode Blue Line 18 pH 3mol/l KCl	Schott
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Knick
Photometer	BioPhotometer RS232 C, Eppendorf

Gerät	Gerätetyp, Hersteller
Photometer	BioPhotometer D30, Eppendorf Nanophotometer P330, Implen
Pipetten (8-Kanal: 200 µl, 100 µl)	ResearchPro, Eppendorf
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Pipetman, Gilson
Pipettierhilfe	Accu-Jet Brand, Wertheim
Präparationsbesteck	
- Präparationsschere	ToughCut® 14058-11, FST
- Springschere	SI-50-4500, 11 cm, Schreiber
- Pinzetten	11253-20, 11251-20, 11271-30, Dumont, FST
Präzisionswaage	BP 2100 S, Sartorius
Real Time PCR-Cycler	Opticon FD-3200, MJ Research CFX Connect, Bio-Rad
Reinstwasseraufbreitungsanlage	Milli-Q Biocell, Millipore Purelab flex, Elga
Schüttler	Duomax 1030, Heidolph Unimax 1010, Heidolph
Schwanenhalslampe	KL 1500 LCD, Schott
Shutter (Ca <sup>2+</sup> -Messapparatur)	Visitron
Stereolupe (Präparation)	Olympus SZX9, Olympus
Stereotakt	TSE System
Sterilwerkbank	Herasafe, Heraeus
Strom/Spannungsquelle	Standard Power Pack 25, Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer Compact Eppendorf
Trockenschrank	FD 115 Binder
Vortexmischer	Vortex Genie 2 Bender und Hobein AG
Wärmelampe	Infrarotlampe 616.00, Beurer
Wasserbad	SW20C Julabo
Zentrifuge (Eppendorf-Reaktionsgefäße)	Centrifuge 5415D, Eppendorf Centrifuge 5417, Eppendorf
Zentrifuge (Falcon-Tubes)	Centrifuge 5702, Eppendorf

## 2.1.2 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Amersham Imager 600	Scan Software Western Blot	GE-Healthcare
AxioVision Rel. 4.8	Histologie (Visualisierung, Auswertung)	Carl Zeiss
Bio-Rad CFX Manager 3.1	qRT-PCR Quantifizierung	Bio-Rad
CorelDRAW X8	Grafikprogramm (Abbildung)	Coral Corporation
ImageJ	Ca <sup>2+</sup> -Messung (Auswertung)	Wayne Rasband
Image Quant TL 7.0	Western Blot Quantifizierung	GE-Healthcare
Magellan 7.2	Messung und Auswertung Enzym-Assay	Tecan
MIRAXViewer	Histologie (Visualisierung, Auswertung)	Carl Zeiss
Opticon Analysis 1.4	qRT-PCR Quantifizierung	MJ Research
Primer 3	qRT-PCR Primer Design	Visual Sonics
Visiview Software	Ca <sup>2+</sup> -Messung	Visitron

### 2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Bezugsquelle
Einmalhandschuhe Nitrile Powder-Free	290418	Abena
Einmalstripetten		Corning
- 5 ml	4487	
- 10 ml	4488	
- 25 ml	4489	
- 50 ml	4490	
Eppendorf-Reaktionsgefäß		
- 1,5 ml	003012.0.086	Eppendorf
- 2,0 ml	72.695.500	Sarstedt
Magnetstäbchen (15 - 50 mm)	C267.1	Carl Roth
Parafilm M	PM-9969	Carl Roth
Pasteurpipetten		Carl Roth
- gestopft	E327.1	
- ungestopft	4522.1	
PCR-Reaktionsgefäß 0,5 ml	30.124.537	Eppendorf
Pipettenspitzen (gestopft)		Greiner BioOne
- 10 µl	765288	
- 20 µl	774288	
- 200 µl	739288	
- 1000 µl	740288	
Pipettenspitzen (ungestopft)		Sarstedt
- 10 µl	701.116	
- 20-200 µl	70.762.010	
- 1000 µl	70.760.012	
Präzisionstücher Kimtech Science	AA64.1	Kimberly Clark
Rotilabo-Spritzenfilter PVDF	P666.1	Carl Roth
Vakuumfiltrationseinheit (Filtropur BT25)	831822	Sarstedt
Waagschalen		Carl Roth
- klein (41 x 41 x 8 mm)	1878.2	
- groß (89 x 89 x 25 mm)	1884.1	
Zählkammer C-Chip DHC-N01	PDHC-N01	Merck Millipore, Biochrom
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	430639	Corning
Zellkulturplatten		Corning
- 6-Well	3516	
- 12-Well	3513	
- 24-Well	3524	
- 96-Well	3599	
Zellkulturschalen		
- 55 cm <sup>2</sup>	821.473.001	Sarstedt
- 8 cm <sup>2</sup>	430165	Corning
Zentrifugenröhrchen		Corning
- 15 ml	430766	
- 50 ml, konisch	430290	
- 50 ml, freistehend	430291	

## 2.2 Versuchsspezifische Materialien, Substanzen, Lösungen und Zellkulturmedien

Alle verwendeten Standardsubstanzen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen und entsprechen dem höchsten Reinheitsgrad für molekularbiologische Analysen. Für die Herstellung aller Lösungen und Puffer wurde autoklaviertes, deionisiertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet. Sämtliche Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen.

### 2.2.1 Genotypisierung

#### Substanzen und Materialien zur DNA-Isolation und PCR

Bezeichnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	07-KK7352-02	PeqLab

#### Primer zur Genotypisierung

Mauslinie	Primertyp	Primerequenz von 5'-3'
Slack	GenoT-1Afor	AGGGGCTGAGAGGGGTCTCG
Slack	GenoT-1Arev	TGGGTAGGGCTGCCACAAGC
Slack	GenoT-2Arev	GCCACAATCTGTTCTTGGCAC

→ Das Primer-Lyophilisat wird in autoklaviertem, deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) in einer Konzentration von 200 pmol/μl (200 μM) gelöst. Die 2 μM Primerstocklösung wird durch eine 1:100 Verdünnung hergestellt.

#### Substanzen und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
DNA-Marker (2-Log DNA-Ladder)	32000-S	New England Biolabs
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	8043.2	Carl Roth
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

#### EDTA 0,5 M, pH 8,0

EDTA	186,1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen	

#### Xylencyanol-Lösung

Xylencyanol	100 mg
dH <sub>2</sub> O	2 ml
→ im Ultraschallbad lösen (15 min)	



<b>Bromphenolblau-Lösung</b>		<b>Agarosegel 2 %</b>	
Bromphenolblau	110 mg	Agarose	2 g
dH <sub>2</sub> O	2 ml	1 x TBE-Puffer	100 ml
<b>DNA-Längenstandard</b>		<b>6x Ladepuffer</b>	
2-Log DNA Ladder	10 µl	Ficoll 400	9 g
6x Ladepuffer	20 µl	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	12 ml
dH <sub>2</sub> O	90 µl	10x TBE-Puffer	30 ml
		Bromphenolblau-Lösung	1,3 ml
		Xylencyanol-Lösung	1,5 ml
<b>10x TBE-Puffer</b>		dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
Tris	108 g	→ Ficoll, EDTA und 10x TBE bei 60 °C rühren (1 h)	
Borsäure	55 g	→ mit dH <sub>2</sub> O auf 47 ml auffüllen	
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 ml	→ Zugabe der Farbstofflösungen	
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml		
→ 1x TBE-Puffer: 1:10 Verdünnung			

## 2.2.2 Histologische Untersuchungen von Gehirnschnitten und CGC-Kulturen

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen für die Gewebepräparation und histologische Untersuchung

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Aceton	9372.4	Carl Roth
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth
Aquatex	1.08562.0050	Merck Millipore
Deckgläser (20 x 60 mm), High Precision	LH26.1	Carl Roth
DePeX Eindeckmittel	HX069485	VWR
DPx new Eindeckmittel	HX55746674	VWR
Einbettmedium NEG-50	6502	Thermo Scientific
Eselnormalserum (NDS)	017-000-121	Dianova
Essigsäure (100 %)	3738.5	Carl Roth
Ethanol (absolut)	32205	Sigma-Aldrich
Färbegestell	H552.1	Carl Roth
Färbekasten mit Deckel	H554.1	Carl Roth
Färbekasten nach Coplin	H548.1	Carl Roth
Fettstift (Hydrophobic Barrier Pen)	H-4000	Vector Laboratories
Formaldehydlösung (35 %)	4979.1	Carl Roth
Hoechst	33258	Sigma-Aldrich
Isopentan	3927.1	Carl Roth
Klingen (Kryotom)	MX35	Thermo Scientific
Kresylviolett-Acetat	C5042	Sigma-Aldrich
Levamisol	SP-500	Vector Laboratories
Natriumacetat-Trihydrat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> x 3 H <sub>2</sub> O)	6779.1	Carl Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	K305	Carl Roth
Objekträger SuperFrost® (26 x 76 mm)	1879.1	Carl Roth

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
PBS	14190-094	Life Technologies
PermaFluor	TA-030-FM	Thermo Scientific
Rinderserumalbumin (BSA)	A8806	Sigma-Aldrich
Saccharose	4621.2	Carl Roth
Streckglas (Glas anti-roll plate, 39,5 mm)	449990	Thermo Scientific
Tris	5429.2	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Xylol	9713.3	Carl Roth
Ziegennormalserum (NGS)	S-1000	Vector Laboratories

## Lösungen zum Fixieren von Gewebe und Zellen

### PFA-Stocklösung 4 %

Paraformaldehyd (PFA)	20 g
PBS	500 ml

- unter Rühren auf 60 °C erhitzen
- nach dem Lösen 30 min bei 60 °C rühren
- 50 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C

### PFA-Lösung 2 %

PFA-Lösung 4 %	25 ml
PBS	25 ml

- 10 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C

### PFA-Lösung 1 %

PFA-Lösung 4 %	12,5 ml
PBS	37,5 ml

- 10 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C

### Saccharose-Lösung 30 %

Saccharose	30 g
NaN <sub>3</sub>	50 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

- steril filtrieren
- 10 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C

### Saccharose-Lösung 8 %

Saccharose-Lösung 30 %	20 ml
dH <sub>2</sub> O	55 ml

- 10 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C

## Lösungen und Puffer für Nissl-Färbung

### Natriumacetat-Lösung 0,1 M

Natriumacetat	1,36 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### Essigsäure-Lösung 0,1 M

Essigsäure 100 %	600 µl
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### Natriumacetat-Pufferlösung pH 3,5

Natriumacetat-Lösung 0,1 M	18 ml
Essigsäure-Lösung 0,1 M	282 ml

- pH-Wert einstellen

**Kresylviolett-Stammlösung 1 %**

Kresylviolett-Acetat	1 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml
→ im Ultraschallbad lösen	
→ filtrieren	

**Kresylviolett-Lösung 0,1 %**

Kresylviolett-Stammlösung	30 ml
Natriumacetat-Pufferlösung	ad 300 ml
→ 30 min rühren	

**Lösungen zur Permeabilisierung von Gewebe und Zellen****Triton X-100 in PBS 0,1 %**

Triton X-100	0,5 ml
PBS	ad 500 ml
→ einrühren	
→ Lagerung bei 4 °C	

**Lösungen zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen****BSA 3 % (+ Serum) für Gewebe**

BSA	3 g
PBS	ad 100 ml
→ kurz vor Gebrauch NGS bzw. NDS Normalseren zugeben	

**PBS + Serum 10 % für CGCs**

NGS	0,5 ml
NDS	0,5 ml
PBS	ad 10 ml
→ kurz vor Gebrauch frisch herstellen	

**Lösungen und Kits IHC-(AP)-Färbung****Bezeichnung****Bestellnummer****Bezugsquelle**

Vectastain® ABC-AP-Kit Standard Alkaline Phosphatase (für ABC-AP-Arbeitslösung)	AK 5000	Vector Laboratories
Vector® Blue Alkaline Phosphatase Substrat-Kit III (für AP-Substrat-Lösung)	SK 5300	Vector Laboratories

**Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2**

Tris	12,1 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,2 einstellen	

**ABC-AP-Arbeitslösung**

PBS	5 ml
Reagenz A	1 Tropfen
Reagenz A	1 Tropfen
→ 30 min im Dunkeln inkubieren	

**AP-Substrat-Lösung**

Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2	5 ml
Levamisol	2 Tropfen
Reagenz 1	2 Tropfen
Reagenz 2	2 Tropfen
Reagenz 3	2 Tropfen

## Verwendete Primärantikörper IHC- und IF-Färbung

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-beta-III Tubulin mAb, clone TuJ-1, IgG2A	Maus	1:1000	R&D Systems, # MAB 1195
Anti-Glial Fibrillary Protein (GFAP)	Kaninchen	1:800	Dako, # Z0334
Anti-KCNT1/Slo2.2/Slack K <sup>+</sup> channel, clone N3/26	Maus	1:100 -1:500	UC Davis/NIH Neuromab Facility
Anti-Slack-B	Hühnchen	1:3000	Leonard K. Kaczmarek (Bhattacharjee et al. 2002)

## Verwendete Sekundärantikörper IHC- und IF-Färbung

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa 488-Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege	1:800	Thermo Fisher, #A11008
Alexa 555-Goat-Anti-Mouse IgG1	Ziege	1:800	Thermo Fisher, #A21127
Biotin-SP AffiniPure Donkey-Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	Ziege	1:1000	Jackson ImmunoResearch, #703-065-155
Biotinylierter-Goat-anti-Mouse IgG	Ziege	1:800	Vector Laboratories, #BA-9200
Cy3-Goat-Anti-Mouse IgG	Ziege	1:800	Dianova, #111-167-003

## Lösungen zum Eindeckeln der Schnitte bzw. Zellen

### Permafluor + Hoechst

Permafluor	10 ml
Hoechst	10 µl

→ vortexen

→ Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt

→ mind. 24 h vorher herstellen um Luftblasen zu vermeiden

## 2.2.3 Stereotaktische intrastriatale Mikroinjektion von NMDA

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen für die striatale Injektion

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (5 g)	PZN 01578681	Bayer
Ethanol, absolut p.a	34963	Sigma-Aldrich
Ethilon 7-0 (schwarz monofilament, 11 mm 3/8 Kreis Rundkörperring)	1696H	Ethicon
Gazin Mullkompressen, 10 x 20 cm, steril, 8-fach (2 x 50 Stk.)	13623; PZN 03449077	Lohmann & Rauscher
Gazin Mullkompressen, 5 x 5 cm, steril, 8-fach (2 x 50 Stk.)	13620; PZN 0344948	Lohmann & Rauscher
Hamilton Serie 700 Microliter®-Spritze, Modell 2, Spitzentyp 3, 10 µl	EY37.1	Carl Roth

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Heizmatte Trixie, 15 x 20 cm, 8 W	76087	Reptiland
Horico® Diamantschleifer	H001014	Hopf, Ringleb & Co
Isofluran	220/96	Aventis
Kanüle 30G (0,3 x 13 mm)	304000	BD
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %, steril	PZN 2159621	Fresenius Kabi
Octenisept Desinfektionsspray	PZN 7463832	Schülke
Skalpell (Feather Disposable) Nr. 11	02.001.30.011	Feather Safety Razor
Skalpell (Feather Disposable) Nr. 21	02.001.30.021	Feather Safety Razor
Spritze 1 ml Luer, BD Plastipak	300013	BD
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-Lösung 30 %	8070.2	Carl Roth
Wattestäbchen, kleiner Kopf, 15 cm lang, steril (2 x 50 Stk.)	3204; PZN 02819968	Careliv Produkte Ohg

### Versuchsspezifische Lösungen für die striatale Mikroinjektion von NMDA

NMDA-Injektionslösung 66,7 mM		Wasserstoffperoxid-Lösung 3 %	
NMDA-Stocklösung 100 mM	33,3 µl	Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %	1 ml
PBS	66,7 µl	dH <sub>2</sub> O	9 ml
→ steril filtrieren		→ Lagerung bei 4 °C	
→ 20 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C			
Loxapin-Stocklösung 1 mg/ml		Loxapin-Injektionslösung 17,5 µg/ml	
Loxapinsuccinat	20 mg	Loxapin-Stocklösung 1 mg/ml	40 µl
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	20 ml	Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	2246 µl
→ steril filtrieren		→ Lagerung bei 4 °C	
→ 40 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C		→ Injektion von 10 µl/g KG	

### 2.2.4 Organentnahme und Zellkultur (Präparation der Cerebelli und Kultivierung primärer Granularzellen)

#### Materialien und Medien zur Organentnahme

Material/Medien	Bestellnummer	Bezugsquelle
Doppelspatel (Länge: 12 cm, Blattbreite: 0,4 cm, Blattlänge: 2,5 cm)	YK51.1	Carl Roth
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	14175-053	Life Technologies
Pinzette Dumont #5 (Biology tip, 11 cm, Inox)	11252-20	FST
Pinzette Dumont #5 Fine Tips (Biology tip, 11 cm, Inox)	11254-20	FST
Pinzette Dumont #7 (gebogen, Standard tip, 11,5 cm, Dumoxel)	11271-30	FST
Pinzette (Iris, gebogen, gezähnt 10 cm)	15915-G	WPI
Schere zur Dekapitation	Keine Angaben	Keine Angaben
Springschere (Iris, 11 cm, Firma: Schreiber, SI-Line, SI-50-4500)	LX76.1	Carl Roth

## Versuchsspezifische Materialien, Substanzen, Lösungen und Medien für die Isolation und Kultivierung primärer Granularzellen

Material/Substanz/Medium	Bestellnummer	Bezugsquelle
AraC (Cytosine $\beta$ -D-arabinofuranosidehydrochloride)	C6645	Sigma-Aldrich
B27 Supplement (50x)	17504-044	Life Technologies
Basal Medium Eagle (BME)	21010-046	Life Technologies
Deckgläser, rund, $\varnothing$ 18 mm	631-0669	VWR
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (DNase)	DN25	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FCS)	10270-106	Life Technologies
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	14175-053	Life Technologies
Kaliumchlorid	P5405	Sigma-Aldrich
L-Glutamin 200 mM (100x)	25030-024	Life Technologies
Neurobasal Medium	21103-049	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) (Pen/Strep)	15140-122	Life Technologies
Poly-L-Lysin (PLL)	P2636	Sigma-Aldrich
Trypanblaulösung 0,4 %	T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin 2,5 % (10x)	15090-046	Life Technologies

### PLL-Stocklösung 2,5 mg/ml

PLL	100 mg
dH <sub>2</sub> O	40 ml
→ mit 10 ml dH <sub>2</sub> O in Vial lösen	
→ in 50 ml <i>Tube</i> überführen + 30 ml dH <sub>2</sub> O	
→ 1 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

### Kaliumchlorid-Stocklösung 2 M

Kaliumchlorid	7,455 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C	

### DNase-Stocklösung 1 %

Deoxyribonuclease I	100 mg
dH <sub>2</sub> O	10 ml
→ 0,5 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

### Ausplattiermedium (50 ml)

BME	44 ml
FCS	5 ml
Pen/Strep	500 $\mu$ l
L-Glutamin (100x)	500 $\mu$ l
→ Lagerung bei 4 °C	

### PLL-Lösung 0,1 mg/ml

PLL-Stocklösung 2,5 mg/ml	0,4 ml
dH <sub>2</sub> O	9,6 ml
→ 1:25 Verdünnung der Stocklösung	
→ immer frisch herstellen	
→ Ansatz für 24-Well Zellkulturplatte	

### AraC-Stocklösung 10 mM

AraC	25 mg
dH <sub>2</sub> O	9,83 ml
→ 1 ml/100 $\mu$ l Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

### BME + Pen/Strep Medium (BP) (50 ml)

BME	50 ml
Pen/Strep	500 $\mu$ l
→ Lagerung bei 4 °C	

### Erhaltungsmedium (50 ml)

Neurobasal Medium	48 ml
B27 Supplement	1 ml
Pen/Strep	500 $\mu$ l
L-Glutamin (100x)	125 $\mu$ l
KCl-Stocklösung 2 M	500 $\mu$ l
AraC-Stocklösung 10 mM	50 $\mu$ l
→ Lagerung bei 4 °C	

## 2.2.5 Exzitotoxizitätsstudien

### Versuchsspezifische Substanzen, Lösungen und Kits für die Exzitotoxizitätsstudien

Ausgangssubstanz/Kit	Bestellnummer	Bezugsquelle
(+)-MK-801 Hydrogenmaleat (MK-801)	M107	Sigma-Aldrich
2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]-quinoxaline-7-sulfonamide-disodium-salt (NBQX)	1044	Tocris
Brain-Derived Neurotrophic Factor Human (BDNF)	B3795	Sigma-Aldrich
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	G1780	Promega
L-Glutaminsäure	G8415	Sigma-Aldrich
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	M3262	Sigma-Aldrich

Glutamat-Stocklösung 15 mM		Glutamat-Lösung 100 µM	
L-Glutaminsäure	25 mg	Glutamat-Stocklösung 15 mM	53 µl
dH <sub>2</sub> O	11,33 ml	Erhaltungsmedium	7,95 ml
→ steril filtrieren		→ Ansatz entspricht der Menge für einen Versuch mit Glutamat, MK-801 und NBQX	
→ 1 ml/60 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C			

MK-801-Stocklösung 10 mM		NBQX-Stocklösung 10 mM	
(+)-MK-801 Hydrogenmaleat	5 mg	NBQX	10 mg
dH <sub>2</sub> O	1,48 ml	dH <sub>2</sub> O	2,63 ml
→ 50 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C		→ 50 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

MK-801-Lösung 10 µM		NBQX-Lösung 10 µM	
MK-801-Stocklösung 10 mM	2 µl	NBQX-Stocklösung 10 mM	2 µl
Lösungsmittel	1998 µl	Lösungsmittel	1998 µl
→ Ansatz für Triplikat (24-Well)		→ Ansatz für Triplikat (24-Well)	
→ Lösungsmittel: Erhaltungsmedium/ Glutamat-Lösung 100 µM		→ Lösungsmittel: Erhaltungsmedium/ Glutamat-Lösung 100 µM	

MK-801 + NBQX-Lösung, je 10 µM	
MK-801-Stocklösung 10 mM	2 µl
NBQX-Stocklösung 10 mM	2 µl
Erhaltungsmedium	1996 µl
→ Ansatz für Triplikat (24-Well)	

NMDA-Stocklösung 100 mM		NMDA-Lösung 300 µM	
NMDA	100 mg	NMDA-Stocklösung 100 mM	11,4 µl
dH <sub>2</sub> O	6,797 ml	Erhaltungsmedium	3800 µl
→ 1 ml/50 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C		→ Ansatz entspricht der Menge für einen Versuch mit NMDA und BDNF	

**BDNF-Stocklösung 5 µg/ml**

BDNF	5 µg
dH <sub>2</sub> O	1000 µl
→ 25 µl/50 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

**BDNF-Lösung 50 ng/ml**

BDNF-Stocklösung 5 µg/ml	18 µl
Lösungsmittel	1800 µl
→ Ansatz für Triplikat (24-Well)	
→ Lösungsmittel: Erhaltungsmedium/ NMDA-Lösung 300 µM	

**BDNF-Lösung 50 ng/ml  
(14 h Präkonditionierung mit BDNF: Tag 1)**

BDNF-Stocklösung 5 µg/ml	24 µl
Erhaltungsmedium	2400 µl
→ Ansatz für 2x Triplikat (24-Well)	

**BDNF-Lösung 50 ng/ml  
(14 h Präkonditionierung mit BDNF: Tag 2)**

BDNF-Stocklösung 5 µg/ml	6 µl
Erhaltungsmedium	600 µl
→ Ansatz für Triplikat (24-Well)	

**BDNF + NMDA-Lösung: 50 ng/ml + 900 µM  
(14 h Präkonditionierung mit BDNF: Tag2)**

BDNF-Stocklösung 5 µg/ml	6 µl
NMDA-Stocklösung 100 mM	5,4 µl
Erhaltungsmedium	600 µl
→ Ansatz für Triplikat (24-Well)	

**Verdünnungsreihe Glutamat**

Zielkonzentration Glutamat	Glutamat-Lösung	Erhaltungsmedium
200 µM	48 µl Stocklösung 15 mM	3552 µl
100 µM	1800 µl Glutamat 200 µM	1800 µl
50 µM	1800 µl Glutamat 100 µM	1800 µl
25 µM	1800 µl Glutamat 50 µM	1800 µl
12,5 µM	1000 µl Glutamat 25 µM	1000 µl

→ Ansatz pro Kondition entspricht der Menge für Triplikate (24-Well)

**Verdünnungsreihe NMDA**

Zielkonzentration NMDA	NMDA-Lösung	Erhaltungsmedium
500 µM	420 µl Stocklösung 100 mM	3980 µl
300 µM	2100 µl NMDA 500 µM	1400 µl
100 µM	1200 µl NMDA 300 µM	2400 µl
50 µM	1500 µl NMDA 100 µM	1500 µl
25 µM	1000 µl NMDA 100 µM	1000 µl

→ Ansatz pro Kondition entspricht der Menge für Triplikate (24-Well)



## Kits zur Bestimmung der LDH-Aktivität

### **CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit**

<b>Bestandteile</b>	<b>Größe</b>	<b>Zusammensetzung/Verwendung</b>
Assay-Puffer	1 x 60 ml	Lösemittel für Substrat-Mix
Substrat-Mix	6 x 1,5 ml	Lösen in 12 ml Assay-Puffer; Substrat für LDH
LDH-Positiv Kontrolle	1 x 25 µl	LDH-Standard-Kurve: 25 U/ml - 800 U/ml
Lyse-Lösung (10x)	1 x 5 ml	9 % v/v Triton® X-100; Lyse der Zellen (60 µl/Well für 45 min)
Stopp-Lösung	1 x 65 ml	1 M Essigsäure; Abstoppen der enzymatischen Reaktion

## 2.2.6 RNA-Analytik

### Versuchsspezifische Materialien, Substanzen, Lösungen und Kits

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
96-Loch-PCR-Platte (Low Multiwell)	MLL-9601	Bio-Rad
DEPC-H <sub>2</sub> O	T143	Carl Roth
Ethanol (absolut)	32205	Sigma-Aldrich
iScript cDNA Synthesis Kit	17008891	Bio-Rad
NucleoSpin® RNA Kit (200 Präparationen)	740955.250	Macherey-Nagel
Primer	diverse	Eurofins
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	1725274	Bio-Rad
Versiegelungsfolie Microseal® 'B'	MSB-1001	Bio-Rad
β-Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth

### **NucleoSpin® RNA Kit (200 Präparationen)**

<b>Bestandteile</b>	<b>Größe</b>	<b>Anmerkungen</b>
Collection <i>Tubes</i> (1,5 ml)	250 Stk.	
Collection <i>Tubes</i> (2 ml)	250 Stk.	
Lyse-Puffer RA1	125 ml	
Membran-Entsalzungs-Puffer MDB	125 ml	
NucleoSpin® RNA Säulen mit Collection <i>Tubes</i>	250	
NucleoSpin® Filter	250	
rDNase (RNase frei, lyophilisiert)	5 Vials	550 µl RNase-freiem H <sub>2</sub> O lösen; Lagerung bei -20 °C; 6 Monate
Reaktions-Puffer für rDNase	30 ml	
RNase-freies H <sub>2</sub> O	60 ml	
Wasch-Puffer Konzentrat RA3	3 x 25 ml	In 100 ml 100% Ethanol lösen; Lagerung bei RT; 1 Jahr
Wasch-Puffer RAW2	80 ml	

### ***iScript cDNA Synthesis Kit***

#### **Bestandteile**

---

5x Reverse Transcription Reaction Mix  
 i-Script Reverse Transcriptase  
 Nuclease-freies H<sub>2</sub>O

### ***Lösungen und Versuchsansätze für RNA-Isolation***

#### **Ethanol 70 %**

---

Ethanol 100 %	35 ml
dH <sub>2</sub> O	15 ml

#### **Zell-Lyse-Mix**

---

RA1-Lösung	350 µl
β-Mercaptoethanol	3,5 µl

→ Ansatz für ein 12-Well  
 → immer frisch herstellen

### ***Lösungen und Versuchsansätze für cDNA-Synthese***

#### **+RT-cDNA-Synthese-Lösung**

---

5x iScript-Mix	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RNA (25,0 ng/µl)	15 µl

→ Ansatz für ein 96-Well  
 → -RT-cDNA-Synthese: halber Ansatz  
 → cDNA 1:7,5 verdünnen  
 → Lagerung bei -20 °C

#### **qRT-PCR-Reaktionsansatz**

---

2x SSO Green Supermix	7,5 µl
Vorwärtsprimer (2 µM)	2,25 µl
Rückwärtsprimer (2 µM)	2,25 µl
cDNA	3 µl

→ Ansatz für ein 96-Well

### **Verwendete Primer für die RNA-Analytik**

<b>Zielgen</b>	<b>Primertyp</b>	<b>Primersequenz von 5' - 3'</b>
Bad	For	GCAGCCACCAACAGTCATCA
	Rev	GGGCTAAGCTCCTCCTCCAT
Bax	For	CCAAGAAGCTGAGCGAGTGT
	Rev	CACCCGGAAGAAGACCTCTC
Bcl-x <sub>L</sub>	For	CGGATTGCAAGTTGGATGGC
	Rev	TGCTGCATTGTTCCCGTAGA
Bcl-2	For	TGAGTACCTGAACCGGCATC
	Rev	GGGGCCATATAGTTCCACAA
BDNF	For	GACGACATCACTGGCTGACA
	Rev	GTCCGCGTCCTTATGGTTTT
BK	For	GACGCCTCTTCATGGTCTTC
	Rev	TAGGAGCCCCCGTATTTCTT
GluA1	For	TGGTGGTGGTGGACTGTGAA
	Rev	GGTTGGCGAGGATGTAGTGG
GluA2	For	AGCACTCCTTAGCTTGATTGAGT
	Rev	CCACTTCTTCTCCGCAGCAG

Zielgen	Primertyp	Primersequenz von 5' - 3'
HPRT	For	CATTATGCCGAGGATTTGGA
	Rev	CCTTCATGACATCTCGAGCA
mGluR1	For	CACAGCCTGCAAAGAGAATGAG
	Rev	GGTAACGGATAGTAATGGGCTC
mGluR5	For	GTTGTACCTTCGGATGCCCA
	Rev	GCCTCCATCCCACCTTTCTCC
NGF	For	TGCCAAGGACGCAGCTTT
	Rev	GGTTCTGCCTGTACGCCG
NR1	For	AGGAAGATCATCTGGCCAGGA
	Rev	GGGCTTGACATACACGAAGGG
NR2A	For	GAGACCCCGCTACACACTCT
	Rev	TCAGCACGATCACCACAAGC
NR2B	For	CGCCCAGATCCTCGATTTCA
	Rev	ACTGGAAGAACATGGAGGACTCA
NT3	For	CGCAAACCTATGTCCGAGCA
	Rev	TCGACAAGGCACACACACAG
p75NTR	For	GACTGAGCGCCAGTTACG
	Rev	GGCGTAGACCTTGTGATCCAT
Slack	For	CTGCTGTGCCTGGTCTTCA
	Rev	AAGGAGGTCAGCAGGTTCAA
Slick	For	CGCTGCGAAGTGGATAGAAC
	Rev	TGGGGCAAAATCTTTCACAG
TGF- $\beta$ 1	For	TAATGGTGGACCGCAACAAC
	Rev	ACTGCTTCCCGAATGTCTGA
TGF- $\beta$ 1 RII	For	CTGTTGCCTGTGTGACTTCG
	Rev	GCCATGTATCTTGCCGTTCC
TNF- $\alpha$	For	CAGCCTCTTCTCATTCTGCT
	Rev	CTGATGAGAGGGAGGCCATT
TrkA	For	TGATCAGGACAAGATGCTCGTG
	Rev	CTCACGCTGAAAGTCCTGCC
TrkB	For	TTTCCGCCACCTTGACTTGT
	Rev	TCCTGGAGAGTCTTGAGCCA
TrkC	For	TTTGCTGCGTCCTTCTGG
	Rev	GTCCTCCTCTCCACTGATAACA

→ Die Oligonukleotid-Lyophilisate wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Zielkonzentration von 200  $\mu$ M eingestellt

## 2.2.7 Proteinanalytik

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Coomassie-Brilliant-Blue G 250	3862.2	Carl Roth
cOmplete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail	11836170001	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
Essigsäure (100 %)	3738.5	Carl Roth
Ethanol G Chromasolv® (absolut)	34963	Sigma-Aldrich
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
Hamiltonspritze	X035	Carl Roth
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol (absolut)	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	K305	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Carl Roth
Natrium-Deoxycholat	3484.1	Carl Roth
Nonidet-P40	74385	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	P5726	Sigma-Aldrich
Phosphatase-Inhibitor Cocktail III	P0044	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure (84,5 %)	6366.1	Carl Roth
Proteinmarker IV	27-2110	PeqLab
PVDF-Membran (Immobilon®-FL Transfer Membran)	IPFL00010	Merck Millipore
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Rotilabo® Blottingpapiere (Dicke: 0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:5) (Acrylamid-Lösung)	3029.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	263.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Tween 20	9127.1	Carl Roth
UV-Küvetten	0030106300	Eppendorf
VivaSpin® 500, 5.000 MWCO	512-4001	VWR
ε-Aminocaprinsäure	A2504	Sigma-Aldrich

## Lösungen und Puffer zur Herstellung von Proteinlysaten und zur Protein-Konzentrationsbestimmung

### SDS-Lösung 10 %

SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### NaCl-Lösung 4 M

NaCl	23,376 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### Nonidet-P40-Lösung 10 %

Nonidet-P40	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### RIPA-Lysepuffer (1 ml)

dH <sub>2</sub> O	607,5 µl
Tris-HCl-Lösung 1 M, pH 8,3	25 µl
NaCl-Lösung 4 M	37,5 µl
SDS-Lösung 10 %	10 µl
Nonidet-P40-Lösung 10 %	100 µl
Na-Deoxycholat-Lösung 5 %	100 µl
Protease-Inhibitor-Stock 10x	100 µl
Phosphatase-Inhibitor Cocktail II	10 µl
Phosphatase-Inhibitor Cocktail III	10 µl
→ immer frisch herstellen	

### 4x Laemmli

SDS	5,0 g
Tris	2,4 g
Glycerin	40 ml
Bromphenolblau	4 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

- mit HCl auf pH 6,7 einstellen
- 1 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C
- 1x Laemmli: 1:4 Verdünnung

### Tris-HCl-Lösung 1 M, pH 8,3

Tris	121,14 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 8,3 einstellen	

### Protease-Inhibitor-Stocklösung 10x

cOmplete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail	1 Tbl
dH <sub>2</sub> O	1 ml
→ Lagerung bei -20 °C für mind. 12 Wochen	

### Natrium-Deoxycholat-Lösung 5 %

Natrium-Deoxycholat	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
→ Lagerung bei RT lichtgeschützt	

### Bradford-Lösung

Coomassie Blau G 250	100 mg
Ethanol (absolut)	50 ml
Phosphorsäure (84,5 %)	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### DTT (Dithiothreitol)-Lösung 1 M

DTT	15,425 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
→ 100 µl Aliquots; Lagerung bei -20 °C	

### 4x Laemmli + DTT 100 mM

4x Laemmli	1 ml
DTT-Lösung 1 M	100 µl

- DTT erst kurz vor Gebrauch zugeben

## Lösungen und Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### Tris-HCl-Lösung 1,8 M, pH 8,8

Tris	218,052 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 8,8 einstellen	
→ autoklavieren	

### Ammoniumperoxodisulfat (APS) 30 %

APS	15 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ 1 ml Aliquots; Lagerung bei -20 °C	
→ kurzfristige Lagerung bei 4 °C möglich	

### Trenngel 10 % (4 Minigele)

dH <sub>2</sub> O	7,4 ml
Tris-HCl-Lösung 1,8 M, pH 8,8	3,6 ml
Rotiphorese (AA-Lsg)	5,7 ml
SDS-Lösung 10 %	167 µl
TEMED	20 µl
APS 30 %	66,6 µl

### Tris-HCl-Lösung 0,6 M, pH 6,8

Tris	72,684 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 6,8 einstellen	
→ autoklavieren	

### Elphor-Puffer 10x

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ mit HCl auf pH 8,3 einstellen	
→ 1x Elphor 1:10 mit dH <sub>2</sub> O verdünnen	

### Sammelgel 5 % (4 Minigele)

dH <sub>2</sub> O	7,2 ml
Tris-HCl-Lösung 0,6 M, pH 6,8	1 ml
Rotiphorese (AA-Lsg)	1,66 ml
SDS-Lösung 10 %	100 µl
TEMED	20 µl
APS 30%	33,2 µl

## Lösungen und Puffer für den Western Blot

### Tris-Lösung 500 mM

Tris	30 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### Anoden-Puffer

Blotting Puffer 2x	200 ml
Methanol	40 ml
dH <sub>2</sub> O	160 ml
→ Lagerung bei 4 °C	

### TBST-Puffer 10x

Tris	12,1 g
NaCl	82,3 g
Tween 20	5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,0 einstellen	

### Blotting-Puffer 2x

Tris-Lösung 500 mM	96 ml
Glycin	2,93 g
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
→ pH-Wert bestimmen	

### Kathoden-Puffer

Blotting Puffer 2x	200 ml
SDS 10 %	800 µl
dH <sub>2</sub> O	200 ml
→ Lagerung bei 4 °C	

### TBST-Puffer 1x

TBST-Puffer 10x	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

<b>AK-Verdünnungslösung</b>		<b>Milchpulver-Lösung 5 %</b>	
BSA	5 g	Milchpulver	5 g
NaN <sub>3</sub>	0,05 g	TBST-Puffer 1x	ad 100 ml
TBST-Puffer 1x	100 ml		
→ Lagerung bei 4 °C		→ frisch herstellen	

### Verwendete Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Akt	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9727
Anti-Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9271
Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9102
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9101
Anti-CREB (48H2) mAb	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9197
Anti-Phospho-CREB (Ser133) (87G3) mAb	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, #9198
Anti-β-Aktin (8H10D10) mAb	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology, #3700

### Verwendete Sekundärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Mouse Cy 3 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare, #PA43009
Anti-Rabbit Cy 5 ECL Plex	Ziege	1:2500	GE Healthcare, #PA45011

## 2.2.8 Ca<sup>2+</sup>-Messung

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C1016	Sigma-Aldrich
Calciummessschälchen (CellView-Zellkulturschale, PS, 35/10 MM, Glasboden)	627860	Bio-One
D(+)-Glucose (BioXtra)	G7528	Sigma-Aldrich
FURA-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM)	344906	Merck Millipore
Glycin	3908.3	Carl Roth
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich
Immersionöl Immersol 518F	444960-0000-000	Zeiss
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	S5761	Sigma-Aldrich
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	M3262	Sigma-Aldrich

## Lösungen und Puffer für die Durchführung der Ca<sup>2+</sup>-Messungen

### Locke-Lösung (2 l)

NaCl	18,00 g
KCl	0,83 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,60 g
CaCl <sub>2</sub>	0,29 g
D(+)-Glucose	2,02 g
HEPES	2,38 g

→ unter Rühren lösen

→ pH-Wert auf 7,4 einstellen

→ steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C

### NMDA 100 µM in Locke-Lösung

NMDA-Stocklösung 100 mM	50 µl
Glycin-Stocklösung 10 mM	50 µl
Locke-Lösung	50 ml

→ am Versuchstag frisch herstellen

### NMDA 100 µM + MK-801-Lösung 2 µM in Locke-Lösung

NMDA-Stocklösung 100 mM	50 µl
Glycin-Stocklösung 10 mM	50 µl
MK-801-Stocklösung 10 mM	10 µl
Locke-Lösung	50 ml

→ am Versuchstag frisch herstellen

### Glycin-Stocklösung 10 mM

Glycin	37,53 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

→ unter Rühren lösen

→ steril filtrieren

→ Lagerung bei 4 °C

### NMDA 300 µM in Locke-Lösung

NMDA-Stocklösung 100 mM	150 µl
Glycin-Stocklösung 10 mM	50 µl
Locke-Lösung	50 ml

→ am Versuchstag frisch herstellen

### NMDA 300 µM + MK-801-Lösung 2 µM in Locke-Lösung

NMDA-Stocklösung 100 mM	150 µl
Glycin-Stocklösung 10 mM	50 µl
MK-801-Stocklösung 10 mM	10 µl
Locke-Lösung	50 ml

→ am Versuchstag frisch herstellen



## **3 Methoden**

### **3.1 Mauszucht**

#### **3.1.1 Tierhaltung**

Alle im Rahmen der Versuche verwendeten Tiere wurden entsprechend den tierschutzrechtlichen Bestimmungen in Gruppen von maximal drei Tieren pro Käfig (Typ II, Makrolon) in der S1-Tierhaltung der Abteilung Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie des Pharmazeutischen Institutes Tübingen gehalten. Die Nachzucht der für die Versuche benötigten Tiere wurde in speziellen Zuchtkäfigen (Typ III, Makrolon) durchgeführt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in einem offenen spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Haltungssystem bei einer Raumtemperatur (RT) von  $22 \pm 2$  °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5$  %. Die Tiere besitzen freien Zugang zu Standard-Nagetierfutter und Wasser bei einem konstanten 12/12 h Hell-/Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 6 Uhr bis 18 Uhr. Grobes Holzeinstreu und Nistmaterial sowie kleine Kunststoffhäuser standen als Beschäftigungsgegenstände (*enrichments*) zur Verfügung. Die durchgeführten Tierversuche waren von der zuständigen Tierschutzbehörde (Regierungspräsidium Tübingen) unter Beachtung der deutschen Tierschutzgesetze genehmigt.

#### **3.1.2 Tiermodell - Slack-Knockout-Mauslinie**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden globale Slack-Knockout Mäuse (Slack-KO, Slack<sup>-/-</sup>) mit C57BL/6N-Hintergrund verwendet, die homozygot eine Deletion des Porenexons (Exon 11) im *Kcnt1*-Gen aufweisen. Als Kontrolltiere fungierten Wildtyp Wurfgeschwister (WT, Slack<sup>+/+</sup>). Die Generierung der Slack-KO Mäuse erfolgte anhand einer sequentiellen Targetingstrategie mittels homologer Rekombination in Verbindung mit einem Cre/loxP-basierten Rekombinationssystem in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durch Dr. A. Bausch (Pharmazeutisches Institut). Die Mauslinie wurde erstmalig 2015 beschrieben (Lu et al. 2015).

Die Verpaarung für den Erhalt der Versuchstiere erfolgte durch Kreuzung heterozygoter Slack<sup>L1/+</sup> Tiere.

#### **3.1.3 Verpaarung der Versuchstiere**

##### **Mäuse für *in vivo* Experimente**

Die Nachzucht der Mäuse für die *in vivo* Experimente erfolgte durch Dauerverpaarung heterozygoter Männchen mit 1 bis 2 ebenfalls heterozygoten Weibchen. Zur Identifizierung waren die Elterntiere mit einem Ohrclip versehen. Nach Bestimmung des Genotyps (siehe 3.2) wurden die Nachkommen im Alter von 21 Tagen von der Mutter abgesetzt und nach

Geschlecht separiert gehalten. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen wurden für die *in vivo* Experimente ausschließlich männliche Wurfgeschwister verwendet.

### **Mäuse für Organentnahmen zur Generierung der CGC-Kulturen**

Die Tiere für die *in vitro* Experimente stammen aus einer Homozygotenzucht. Dafür wurden jeweils homozygote WT bzw. Slack-KO Mäuse ab einem Mindestalter von 6 (Weibchen) bzw. 8 Wochen (Männchen) in speziellen Zuchtkäfigen verpaart. Zur Identifizierung der Elterntiere wurden die Mäuse in einem Alter von ca. 3 Wochen mit einem Ohrclip versehen und nachfolgend mittels einer Schwanzbiopsie die Genotypisierung (siehe 3.2) durchgeführt. Die Organentnahme erfolgte 7 Tage nach der Geburt (postnatal, P 7) der Nachkommen.

## **3.2 Genotypisierung**

### **3.2.1 DNA-Isolierung**

Die Isolierung der Maus-DNA aus den Schwanzspitzen erfolgt mit Hilfe des *KAPA Mouse Genotyping Kits* (siehe 2.2.1), welches eine schnelle und einfache Extraktion sowie Amplifikation der DNA ermöglicht. Das KAPA-Kit enthält neben dem Extraktionsenzym (*KAPA Express Extract Enzyme* (1 U/ $\mu$ l)), den Extraktionspuffer (*KAPA Express Extract Buffer* (10x)), sowie einen PCR-Mix, bestehend aus der DNA-Polymerase, dem Reaktions- und Ladepuffer, den Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Magnesiumchlorid (*KAPA2G Fast Genotyping Mix* (KAPA2G)).

Vor Beginn der eigentlichen DNA-Isolierung wird für die Anzahl an Genotypisierungsansätzen (Biopsien) ein Mastermix, bestehend aus Extraktionsenzym- und puffer, sowie dH<sub>2</sub>O, hergestellt. Dafür werden pro Extraktionsansatz 2  $\mu$ l Extraktionsenzym, 10  $\mu$ l Extraktionspuffer und 88  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O benötigt. Zunächst erfolgt die Inkubation der Schwanzspitzenbiopsien in einem Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) mit 100  $\mu$ l Mastermix bei 75 °C und 500 rpm für 10 min in einem Thermoschüttler. Dabei kommt es durch die Aktivität der Protease zur Lyse der Zellen und zur Degradierung von Proteinen und Nukleasen, wodurch die DNA freigesetzt wird. Nach Erhitzen der Proben für 5 min bei 95 °C und 500 rpm um die Enzymaktivität zu inaktivieren werden diese zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand, welcher die DNA enthält, abgenommen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Proben können nun bis zur weiteren Verwendung für eine kurze Zeit bei 4 °C gelagert werden.

### 3.2.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische enzymatische Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen (Mullis und Faloona 1987). Die Durchführung der PCR erfolgt in einem Thermocycler und ähnelt im Ablauf der natürlichen Replikation der DNA. Während eines jeden PCR-Zyklus werden, bedingt durch ein spezifisches Temperaturprotokoll, folgende 3 Phasen durchlaufen: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Während der Denaturierungsphase kommt es durch Erhitzen der Probe auf 95 °C zur Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen und somit zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA. Nachfolgend wird die Probe auf 59,7 °C abgekühlt. Dies ermöglicht die Anlagerung der beiden Primer (siehe 2.2.1) an die zu amplifizierende Nukleotidsequenz des einzelsträngigen DNA-Abschnittes. Dabei hybridisiert der sogenannte Vorwärtsprimer (*forward primer*, F) an das 3'-Ende des kodierenden DNA-Strangs, während der Rückwärtsprimer (*reverse primer*, R) an das 3'-Ende des Komplementärstranges bindet. Durch entsprechende Auswahl der Oligonukleotidsequenz der Primern können genetische Veränderungen der Maus-DNA identifiziert werden. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen WT und Slack-KO Tieren. Während der nachfolgenden Elongationsphase bei 72 °C synthetisiert die DNA-Polymerase (*KAPA2G Fast Hot Start DNA Polymerase*) unter Verwendung der verfügbaren dNTPs einen komplementären Strang zur primerflankierten Sequenz in 5' - 3'-Richtung. Insgesamt werden 30 solcher Zyklen durchlaufen. Da die neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrize dienen, erfolgt dabei eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments. Die Durchführung der PCR erfolgt in 500 µl Eppendorf PCR-Gefäßen (siehe 2.2.1). Alle Genotypisierungs-PCRs wurden nach demselben Schema pipettiert (siehe Tabelle 3.1, Genotypisierungsansatz). Dabei werden zunächst 24 µl Mastermix vorgelegt und dann 1 µl DNA hinzu pipettiert. Das Temperaturprotokoll für den Thermocycler ist in der nachfolgenden Tabelle 3.2 dargestellt. Da es sich bei der im KAPA-Kit enthaltenen DNA-Polymerase um eine *Hot Start* DNA-Polymerase handelt, muss diese vor Beginn der eigentlichen PCR bei einer Temperatur von 92 °C aktiviert werden.

**Tabelle 3.1: Pipettierschemata zur DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion**

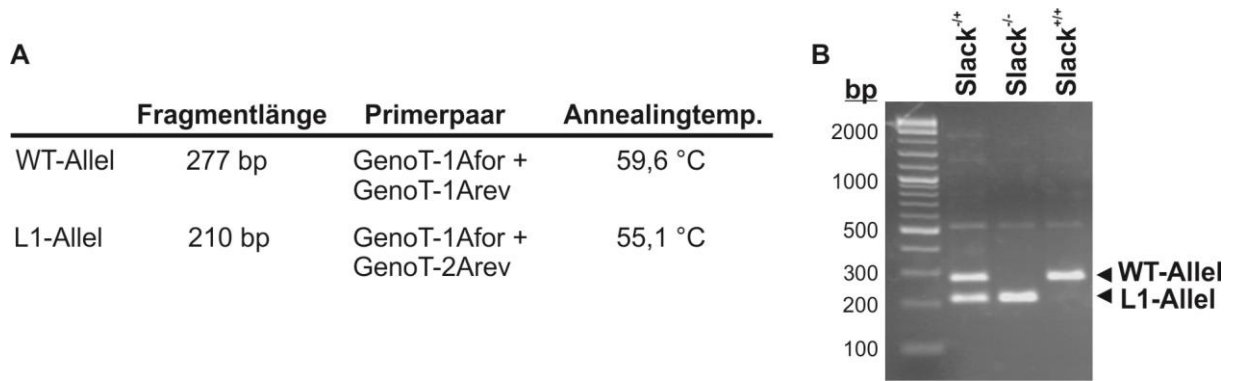
<b>10x Slack Primer (4 µM pro Primer)</b>		<b>Genotypisierungsansatz (25 µl pro Probe)</b>	
GenoT-1Afor (200 pmol/µl)	20 µl	DNA	1 µl
GenoT-1Arev (200 pmol/µl)	20 µl	2x KAPA2G Genotyping Mix	12,5 µl
GenoT-1Arev (200 pmol/µl)	20 µl	10x Slack Primer (4 µM pro Primer)	1 µl
dH <sub>2</sub> O	940 µl	dH <sub>2</sub> O	10,5 µl
→ 100 µl Aliquots, Lagerung bei -20			

**Tabelle 3.2: PCR-Programm für die Genotypisierung**

PCR-Programm			
T1	95 °C	3 min	
T2	95 °C	15 sec	
T3	59,7 °C	15 sec	30 Zyklen
T4	72 °C	15 sec	
T5	72 °C	5 min	

### 3.2.3 Detektion der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese

Nachfolgend werden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese gemäß ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Bestimmt durch die negative Ladung der Nukleotideinzelbausteine wandern diese im elektrischen Feld zur Anode. Aufgrund des elektrischen Widerstands ist die Geschwindigkeit mit der die DNA-Moleküle das Agarosegel durchwandern umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Als Elektrophoresepuffer für die Gelelektrophorese dient 1x TBE-Puffer (siehe 2.2.1). Dieser weist einen pH-Wert von 8,0 auf, wodurch der polyanionische Zustand der DNA garantiert wird. Damit die aufgetrennten Fragmente entsprechend ihrer Größe charakterisiert werden können wird ein Längenstandard (2-Log DNA-Ladder, siehe 2.2.1), der DNA-Fragmente definierter Größe enthält, aufgetragen. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wird ein 2 %-iges Agarosegel (siehe 2.2.1) verwendet. Zur Herstellung des Gels wird die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wird diese Agarose-Lösung so lange auf einem Magnetrührer gerührt bis sie auf RT abgekühlt ist. Kurz vor dem Gießen des Gels werden 0,1 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid zur Agarose-Lösung zugegeben. Dieser interkaliert in die DNA und ermöglicht die spätere Visualisierung der Fragmente. Nach dem Gießen des Gels in die dafür vorgesehene Gelgießekammer (siehe 2.1.1) werden spezielle Kämmen eingesetzt. Dadurch entstehen beim Aushärten des Gels die Probenaschen. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels werden die Proben sowie der Längenstandard in die dafür vorgesehenen Gel-Taschen aufgetragen. Nachfolgend erfolgt die Auftrennung im elektrischen Feld. Dazu wird für etwa 15 min eine Spannung von 80 V angelegt bis die Proben aus den Geltaschen herausgelaufen sind. Anschließend wird die Spannung auf 120 V erhöht. Die Gesamtdauer der Elektrophorese beträgt ca. 1 bis 2 Stunden. Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung können die DNA-Banden aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids mit Hilfe eines UV-Geldetektionsgeräts (siehe 2.1.1) sichtbar gemacht werden. Je nach Laufdistanz der Banden und somit der Größen der PCR-Fragmente können diese dem jeweiligen Genotyp zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Exemplarisches Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR der Slack-Mauslinie**

**A** Größe (in bp) der erwarteten DNA-Amplifikate **B** Repräsentative Darstellung der PCR-Ergebnisse von heterozygoten  $Slack^{+/-}$ -Mäusen sowie homozygoten  $Slack^{-/-}$ -Mäusen und  $Slack^{+/+}$ -Kontrollmäusen; WT: Wildtyp, 277 bp; L1: Knockout, 210 bp.

### 3.3 Immunfärbung der Gehirnschnitte und CGC-Kulturen zum Nachweis des Slack-Kanals

#### 3.3.1 Fixierung der Gewebe und Anfertigung von Kryoschnitten

Um einen möglichst optimalen Gewebeerhalt und eine nachfolgend gute Immunfärbung zu erzielen wird eine kardiale Perfusionsfixierung des murinen Gehirngewebes mit einer 1 %-igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (siehe 2.2.2) durchgeführt. Dabei wird diese mit Hilfe eines speziellen Perfusorsystems über eine Kanüle mit 0,6 mm Durchmesser direkt über den linken Herzventrikel der Maus zugeführt. Über den Blutweg werden insgesamt 50 ml der PFA-Lösung durch den Körper der Maus transportiert, wobei es u. a. zur Fixierung des Gehirns kommt. Anschließend erfolgt die Präparation des Gehirns, welches nachfolgend sofort in Isopentan eingefroren wird. Dazu wird dieser in flüssigem Stickstoff auf  $-40\text{ °C}$  bis  $-60\text{ °C}$  abgekühlt. Bis zur Herstellung der Gewebeschnitte werden die Gehirne bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wird das gefrorene Gehirngewebe mit einer kleinen Menge NEG-50 auf dem Objektisch fixiert. Die Schneidetemperatur des Kryotoms (siehe 2.1.1) wird dabei auf  $-20\text{ °C}$  Gewebetemperatur und  $-23\text{ °C}$  Messertemperatur eingestellt. Anschließend werden  $10\text{ }\mu\text{m}$  dünne Gehirnschnitte angefertigt und mit einem Objektträger aufgenommen. Dabei werden pro Objektträger je zwei WT und Slack-KO Gehirnschnitte gleicher Hirnregionen aufgezogen. Dies ermöglicht die gleichzeitige Immunfärbung (siehe 0 und 3.3.3) von WT und Slack-KO Gewebe, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird.

### 3.3.2 Immunhistochemie zum Nachweis von Slack in Gehirnschnitten

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht die Visualisierung bestimmter Strukturen und Proteine in Gewebeschnitten. Durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion bindet der verwendete Primärantikörper mit hoher Affinität an ein bestimmtes Epitop des zu detektierenden Proteins. Nachfolgend wird der Primärantikörper durch einen Sekundärantikörper markiert. Dieser erkennt spezifische konservierte IgG-Strukturen des jeweiligen Organismus in dem der Primärantikörper generiert wurde. Im Anschluss an die Antikörper Interaktion erfolgt die Visualisierung mit Hilfe eines Detektionssystems, wie z. B. dem *Vectastain-ABC-Kit* (siehe 2.2.2).

Vor der Färbung müssen die Gewebeschnitte (siehe 3.3.1) zunächst aufgetaut (10 min) und mit einem Fettstift (siehe 2.2.2) umrandet werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die später aufzutragenden Färbe- und Waschlösungen (je 800 µl) auf dem Objektträger verbleiben. Anschließend werden die Schnitte 2 x 5 min mit PBS gewaschen (überschichtet), bevor sie für 5 min mit 0,1 Triton X-100-Lösung in PBS (siehe 2.2.2) permeabilisiert werden. Nun erfolgt die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Dazu werden die Gewebeschnitte für 1 h mit einer Blockierungslösung, bestehend aus 3 % Rinderalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) und 10 % Normalziegenserum (NGS) in PBS (siehe 2.2.2), überschichtet. Danach erfolgt die Inkubation mit verdünntem Primärantikörper in 3 %-iger BSA-Lösung (siehe Tabelle 3.3) bei 4 °C über Nacht. Zudem wird für jede Färbung eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Dazu wird ein Objektträger mit 3%-iger BSA-Lösung ohne den spezifischen Primärantikörper inkubiert, wodurch mögliche Hintergrundfärbungen dargestellt werden können. Am darauffolgenden Tag werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie für 1 h bei RT mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.3) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS (3 x 5 min) wird die ABC-Arbeitslösung (siehe 2.2.2), die das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat enthält aufgetragen und für 30 min inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Lösung bereits 30 min zuvor hergestellt werden sollte und bis zur Verwendung im Dunkeln gelagert werden muss. Während der Inkubation der Gewebeschnitte bindet das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) erfolgte die Zugabe des Alkalische-Phosphatase (AP)-Substrates (siehe 2.2.2). Dieses enthält BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) und wird von der AP zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt. Die Farbreaktion wird nach 10 - 20 min (je nach Farbentwicklung) durch Leitungswasser (5 min im Färbetrog) gestoppt. Zudem wird dem AP-Substrat Levamisol als Inhibitor endogener Phosphatasen zugesetzt um eine Reduktion der Hintergrundfärbung zu erreichen. Anschließend werden die Schnitte luftblasenfrei mit 150 µl Aquatex-Eindeckmittel (siehe 2.2.2) eingedeckelt. Nach dem Aushärten werden

repräsentative Aufnahmen aller Konditionen mit Hilfe eines Histologiescanners (Panoramic Desc, 3D Histech, siehe 2.1.1) angefertigt.

**Tabelle 3.3: Verwendete Antikörper für die IHC-Färbung der Gehirnschnitte**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Slo2.2 (Neuromab)	1:200	Biotin-SP AffiniPure Donkey-Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	1:800

### 3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Slack in Gehirnschnitten

Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine spezielle Methode der Immunhistochemie. Zur Visualisierung der spezifischen Gewebe- bzw. Zellstrukturen werden dabei meist fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung verläuft weitestgehend analog zur IHC-Färbung (siehe 3.3.2). Da jedoch der Sekundärantikörper direkt an ein Fluorophor gekoppelt ist, entfällt die enzymatische Kopplung und Substratumsetzung nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Durch Anregung dieser Fluorophore bei entsprechender Wellenlänge im Rahmen der mikroskopischen Betrachtung können durch Primärantikörper markierte Strukturen optisch dargestellt werden. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorophore sollte die Inkubation des Gewebes mit verdünnter Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper-Lösung (siehe Tabelle 3.4) unter Lichtausschluss erfolgen. Auch die nachfolgenden Waschschrte sowie das Eindeckeln sollten unter möglichst wenig Lichtexposition geschehen. Eingedeckelt werden die Gewebeschnitte mit einer Mischung aus Permafluor und Hoechst (ca. 80 - 100 µl pro Deckglas, siehe 2.2.2). Hoechst interkaliert in die DNA und dient somit als Kernfärbung. Nach kurzem Aushärten bei RT können repräsentative Aufnahmen an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioimager Z1, Zeiss, siehe 2.1.1) mit einem 20x oder 63x Objektiv gemacht werden.

**Tabelle 3.4: Verwendete Antikörper für die IF-Färbung der Gehirnschnitte**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Slo2.2 (Neuromab)	1:100	Alexa 555-Goat-Anti-Mouse IgG1	1:800

### **3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der Neuronenpopulation der CGC-Kulturen**

Für die Immunfärbung werden die cerebellären Granularzellen auf Deckgläsern in 12-Wellplatten kultiviert (siehe Abschnitt 3.5 und Tabelle 3.9). Die Deckgläser müssen vor der Beschichtung mit Poly-L-Lysin (PLL) (siehe 3.5.1) zunächst noch vorbehandelt werden. Dazu werden sie in einem Becherglas über Nacht auf dem Schüttler in konzentrierter Salpetersäure (65 %) gewaschen. Dabei wird ihre Oberfläche angeätzt, wodurch das PLL später besser anhaften kann. Am darauffolgenden Tag werden die Deckgläser 4-mal mit je 100 ml frischem Milli-Q-Wasser für je 2 h gewaschen. Anschließend werden sie mit konzentriertem Ethanol überschichtet und für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Abgießen des Ethanols erfolgt die vollständige Trocknung der Deckgläser im Heißluftschrank. Die Präparation der Cerebelli, Isolation sowie Kultivierung der Granularzellen entsprechend der in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Durchführung.

Die Immunfärbung der CGC-Kulturen erfolgt an DIV 7. Dazu wird das Erhaltungsmedium eines Wells vorsichtig abgenommen und durch 0,5 ml einer 37 °C warmen 2 % Paraformaldehyd-/4 % Saccharose-Lösung (siehe 2.2.2) ersetzt. Diese dient der Fixierung der Zellen (10 min, RT). Nachfolgend erfolgt die Permeabilisierung der Zellen, dazu werden die Deckgläser für 10 min mit 0,5 ml einer 0,1%-igen Triton X-100-Lösung überschichtet. Im Anschluss daran wird mit 0,5 ml PBS gewaschen, bevor die unspezifischen Bindungsstellen durch die Zugabe von 0,5 ml Blockierungslösung (5% Normaleserum (NDS) und 5 % Normalziegenserum (NGS) in PBS) für 1 h abgesättigt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation mit verdünntem Primärantikörper in 5 % NDS und 5 % NGS in PBS (250 µl pro Deckglas). Dafür werden die Wellplatten mit den Deckgläsern bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Deckgläser zunächst 3 x mit je 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit verdünntem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in 5 % NDS und 5 % NGS in PBS (250 µl pro Deckglas) inkubiert. Hierbei ist auf eine möglichst geringe Lichtexposition zu achten. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) werden die Deckgläser vorsichtig mit Hilfe einer gebogenen Pinzette (siehe 2.2.2) entnommen und durch Tippen auf einem Kimtech®-Tuch abgetupft. Anschließend werden sie mit der Zellseite nach unten auf einem Tropfen (15 µl) einer Mischung aus Permafluor und Hoechst (siehe 2.2.2) auf einen Objektträger platziert, wodurch die Färbung fixiert wird. Aufgrund seiner interkalierenden Fähigkeiten ermöglicht Hoechst die Anfärbung der Zellkerne. Überschüssiges Eindeckmedium wird vorsichtig mit einem Kimtech®-Tuch entfernt. Nach dem Aushärten des Eindeckmediums werden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack versiegelt und es können repräsentative Aufnahmen der gefärbten CGC-Kulturen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioimager Z1, Zeiss, siehe 2.1.1) und einem 20x oder 63x Objektiv gemacht werden.



**Tabelle 3.5: Verwendete Antikörper für die IF-Färbung zur Charakterisierung der CGC-Kulturen**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-beta-III Tubulin mAb, Clone TuJ-1, IgG2A	1:200	Alexa 555-Goat-Anti-Mouse IgG1	1:800
Anti-Glial Fibrillary Protein (GFAP)	1:500	Alexa 488-Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:800

### 3.3.5 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Slack in CGC-Kulturen

Der immunhistochemische Nachweis von Slack in den cerebellären Granularzellen erfolgt weitestgehend analog zu der in Abschnitt 0 beschriebenen IF-Färbung der Neurone. So sind alle Schritte die die Vorbereitung, Kultivierung und Fixierung der Neurone betreffen sowie der erste Tag der Färbung identisch. Am zweiten Tag unterscheiden sich jedoch die Färbeprotokolle der IHC- bzw. IF-Färbung. So muss bei der IHC-Färbung nach der Sekundärantikörper-Inkubation eine nachträgliche enzymatische Kopplung und Substratumsetzung mit Hilfe des *Vectastain-ABC-Kits* (siehe 2.2.2) erfolgen. Die Durchführung entspricht der AP-Immunmarkierung von Gewebeschnitten (siehe 3.3.2). Lediglich die verwendeten Volumina der Färb-/Waschlösungen differieren. So werden für die Waschschrte der Deckgläser je 0,5 ml PBS verwendet und die Inkubation mit Sekundärantikörper-Lösung bzw. ABC-Arbeitslösung und AP-Substrat erfolgt mit jeweils 250 µl bzw. 500 µl pro Deckglas. Diese Versuche wurden von Katharina Wild im Rahmen ihrer Masterarbeit im AK Lukowski durchgeführt (Wild 2016).

**Tabelle 3.6: Verwendete Antikörper für den IHC-Nachweis von Slack in CGC-Kulturen**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Slack-B (L.K. Kaczmarek)	1:3000	Biotinylierter-Goat-anti-Chicken IgG	1:1000

### 3.3.6 Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der zeitabhängigen neuronalen Schädigung während der NMDA-Exzitotoxizität

Die Immunfluoreszenzfärbung mit  $\beta$ III-Tubulin Primärantikörper dient der Visualisierung der neuronalen Schädigung im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität. Die Durchführung erfolgt analog zu der in Abschnitt 0 beschriebenen IF-Färbung zur Charakterisierung der Neuronenpopulation innerhalb der CGC-Kultur. Einziger Unterschied zwischen den Experimenten ist, dass die Zellen (DIV 7) im Rahmen der exzitotoxischen Visualisierung zunächst für einen Zeitraum von 1 h - 24 h mit 300 µM NMDA (siehe 2.2.5) inkubiert werden, bevor die IF-Färbung durchgeführt wird. Dabei erfolgt die Entnahme der Deckgläser sowie die nachfolgende IF-Färbung der Neurone nach 1 h, 6 h und 24 h NMDA-Inkubation. Zur Kontrolle werden auch Deckgläser mit nicht stimulierten Neuronen gefärbt. Im Anschluss

können mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioimager Z1, Zeiss, siehe 2.1.1) und einem 20x oder 63x Objektiv repräsentative Aufnahmen der gefärbten CGC-Kulturen gemacht werden. Dies ermöglicht die visuelle Darstellung des Verlaufs der NMDA-induzierten Neuronenschädigung.

**Tabelle 3.7: Verwendete Antikörper für die IF-basierte Verlaufsdarstellung der Exzitotoxizität**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-beta-III Tubulin mAb, Clone TuJ-1, IgG2A	1:200	Cy3-Goat-Anti-Mouse IgG1	1:800

### **3.4 Stereotaktische Injektion von NMDA ins Striatum**

Für die stereotaktische NMDA-Injektion wurden ausschließlich männliche WT und Slack-KO Wurfgeschwisterpaare im Alter von 10 - 21 Wochen als Versuchstiere verwendet. Die Gewichtsbestimmung der Mäuse erfolgt sowohl vor der stereotaktischen Operation als auch am Tag nach der OP.

#### **3.4.1 Durchführung der striatalen Mikroinjektion**

##### **Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose**

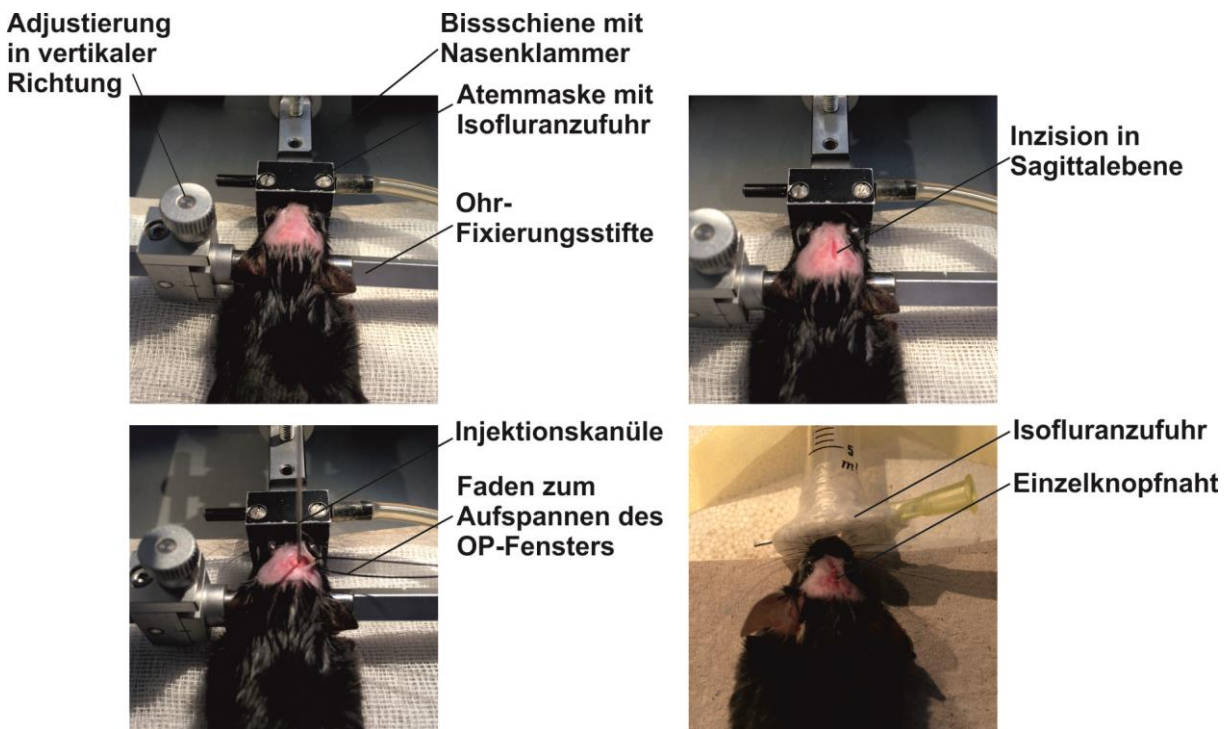
Die Narkose der Tiere erfolgt durch die inhalative Applikation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemischs (siehe 2.2.3). Dies ermöglicht eine sehr gute Steuerung der Narkosetiefe und -dauer. Dabei wird ein Narkosekreissystem (siehe 2.1.1), bestehend aus einem integrierten Ventilator und vorgeschalteten Isofluran-Verdampfer verwendet. Über eine spezielle Inhalationsmaske kann die Maus das verdampfte Narkotikum einatmen. Zur Narkoseeinleitung wird dem Sauerstoff 5 - 6 % Isofluran beigemischt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Operation wird ein Isofluran-Anteil von 1 - 2 % angestrebt. Um eine Unterkühlung der Maus während der Operation zu vermeiden findet diese auf einer beheizten Matte (siehe 2.1.1) statt. Vor und während der Operation erfolgt eine wiederholte Überprüfung der Narkosetiefe der Tiere. Lid- und Zwischenzehenreflexe müssen zu allen Zeitpunkten ausgeschaltet sein.

##### **Durchführung der stereotaktischen Injektion und postoperative Versorgung**

Vor Beginn der eigentlichen Operation wird eine Augensalbe (siehe 2.2.3) aufgetragen und mit Hilfe eines Skalpells (siehe 2.2.3) das Fell am Schädel entfernt. Anschließend wird die Maus in Brustlage in einem stereotaktischen Fixationsrahmen (siehe 2.1.1) positioniert. Dazu wird sie mit den oberen Vorderzähnen (*Dentes incisivi*) in eine Bisschiene eingehängt und mit Hilfe einer Nasenklammer vorsichtig fixiert. Die Nasenklammer ist über einen dünnen Schlauch an den Isofluran-Verdampfer angeschlossen und dient neben der Fixierung der

Maus auch der Isofluran-Zufuhr während der OP. Zur weiteren Fixierung werden zwei seitlich am Rahmen angebrachte Stifte waagrecht in den knöchernen Gehörgang der Maus (*Meatus acusticus externus*) eingeführt. Die beiden Stifte können in ihrer Höhe verstellt werden, wodurch eine waagrechte Ausrichtung des Kopfs ermöglicht wird. Dies ist notwendig um später ein senkrechtes Einführen der Hamilton-Mikroliterspritze (siehe 2.2.3) zu gewährleisten. Nach Desinfektion der Kopfhaut (*Cutis*) mit einem schleimhautverträglichen Desinfektionsspray (siehe 2.2.3) wird eine ca. 3 - 5 mm lange Inzision in Sagittalebene durchgeführt. Für eine bessere Sicht während der OP wird mit Hilfe eines gespannten Fadens die Inzisionsstelle gespreizt und das *Periost* entfernt. Dadurch sind die Kreuzungspunkte der Knochennähte *Structura lambdaidea (Lambda)* und *Bregma* gut zu erkennen. Unterstützend kann der freigelegte Knochen noch mit einer 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung (siehe 2.2.3) betupft werden, wodurch die beiden Orientierungspunkte noch besser sichtbar werden. Nun wird nochmals die waagrechte Ausrichtung des Schädels überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. Die beiden Orientierungspunkte *Lambda* und *Bregma* müssen sich auf gleicher Höhe befinden. Anschließend wird mit Hilfe der stereotaktischen Apparatur die korrekte Position für die Einstichstelle ermittelt. Diese befindet sich ausgehend vom *Bregma* 0,5 mm *rostral* und 1,7 mm *lateral* rechts. In entsprechender Position wird mit einem feinen Zahnbohrer (siehe 2.1.1) ein kleines Loch mit einem Durchmesser von 1 - 2 mm in die Schädeldecke gebohrt. Mit einer 10 µl-Hamilton-Mikroliterspritze werden 20 nmol NMDA (siehe 2.2.3) bzw. für die Kontrollgruppe PBS in 3,5 mm Tiefe ins Striatum injiziert. Die Injektion von insgesamt 300 nl einer 66,7 mM NMDA-Lösung bzw. PBS erfolgt mit einer Injektionsrate von 50 nl/min. Nachfolgend wird die Spritze für weitere 5 min in dieser Position belassen um einen Reflux der injizierten Lösung zu verhindern. Während der gesamten Operation werden die Wundränder, sowie die Schädeldecke regelmäßig mit PBS befeuchtet. Nach Entfernen der Spritze wird die Operationswunde mit vier bis fünf Einzelknopfnähten verschlossen. Zudem wird die OP-Naht mit einer schmerzstillenden Lidocain-Salbe (Xylocain 5 %) versorgt. Bevor die Maus in einen frischen Käfig gelegt wird, werden ihr 10 µl/kg KG isotonische Kochsalzlösung 0,9 % (siehe 2.2.3) i. p. verabreicht, um den Flüssigkeitsmangel infolge der Narkose wieder auszugleichen. Um ein Verkleben der Atmungsorgane mit Einstreu zu vermeiden, wird der Käfig zuvor mit frischem Zellstoff ausgelegt. Die Tiere werden bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose unter einer Wärmelampe (siehe 2.1.1) auf Körpertemperatur gehalten.

In einer zweiten Versuchsreihe wird den Tieren ca. 20 min vor Beginn der eigentlichen stereotaktischen Mikroinjektion systemisch Loxapin verabreicht (0,175 µg/g KG, i. p., siehe 2.2.3) (Lu et al. 2015). Die nachfolgende Injektion von NMDA bzw. PBS erfolgt analog der oben beschriebenen Versuchsdurchführung.



**Abbildung 3.2: Versuchsdurchführung der stereotaktischen NMDA-Mikroinjektion**

Die Bilder zeigen den Aufbau sowie den Ablauf der stereotaktischen intrastriatalen Mikroinjektion von PBS bzw. NMDA-Lösung.

### 3.4.2 Histologische Quantifizierung des Läsionsareals

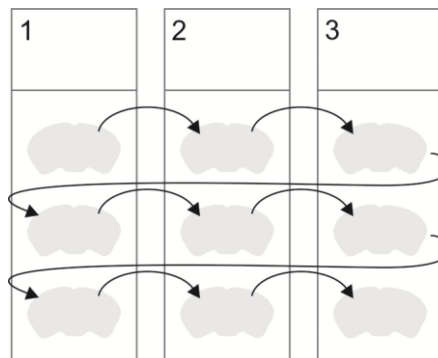
#### Entnahme der Mausgehirne

Die Tiere werden 24 h nach der striatalen NMDA-Injektion durch CO<sub>2</sub>-Einleiten in den Käfig eingeschlüfert. Direkt im Anschluss erfolgt die Gehirnentnahme. Dazu wird zunächst die Kopfhaut der Maus mit einer feinen Präparationsschere entlang der Operationsnaht aufgeschnitten. Diese kann dabei mit einer Pinzette leicht angehoben werden, was das Vorgehen erleichtert. Anschließend erfolgt die Eröffnung des Schädels. Dazu wird eine Springschere vorsichtig ins *Foramen magnum* eingeführt und der Schädel beidseitig kranial über *das Os occipitale* in Richtung *Os frontale* aufgeschnitten. Zudem wird ein medialer Schnitt in *kranialer* Richtung durchgeführt. Im Anschluss erfolgt die Durchtrennung des Nasenbeins (*Os nasale*). Nun können die beiden Hälften der Schädeldecke vorsichtig mit Hilfe einer gebogenen Pinzette abgenommen werden. Mit einem abgerundeten Spatel wird das Gehirn nach *dorsal* geklappt und die Hirnnerven werden durchtrennt. Anschließend wird das Gehirn nach der Durchtrennung des Rückenmarks vorsichtig herausgehoben. Zum Erhalt der Gewebestruktur wird nachfolgend eine Immersionsfixierung des Gehirns durchgeführt. Dazu wird dieses in 2 %-ige PFA-Lösung (siehe 2.2.3) überführt und für 24 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dabei kommt es zur chemischen Quervernetzung und somit zur Fixierung der Proteine. Bevor die Gehirne eingefroren werden können, werden sie für 24 h bei 4 °C in 30 %-iger Saccharose-Lösung (siehe 2.2.3) gehalten. Dies dient der

Dehydrierung der Zellen und somit der Protektion des Gewebes vor Einfrierschäden. Die Gehirne werden nun in der gewünschten Orientierung in NEG-50 Einbettmedium (siehe 2.2.2) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### Anfertigung der Kryoschnitte

Mit einem Kryotom (siehe 2.1.1) werden in koronarer Schnittebene  $20\text{ }\mu\text{m}$  dünne Gehirnschnitte angefertigt. Die Objekttemperatur wird auf  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , die Messertemperatur auf  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingestellt. Die Gewebeschnitte werden auf speziell dafür vorgesehene Superfrost-Objektträger (siehe 2.2.22.2.3) aufgezogen. Dabei werden pro Objektträger jeweils 3 Schnitte aufgenommen. Da für die Quantifizierung des Läsionsvolumens nur jeder dritte Objektträger gefärbt und ausgewertet werden soll, werden die Schnitte gemäß der in Abbildung 3.3 dargestellten Reihenfolge auf die Objektträger aufgezogen. Nach einer 30 min Trocknungszeit können die Schnitte für die histologische Färbung genutzt werden. Soll die Färbung erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, müssen die Schnitte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in entsprechenden Objektträgerboxen gelagert werden.



**Abbildung 3.3:** Herstellung der Serienschnitte und Reihenfolge in der die Gehirnschnitte auf die Objektträger aufgezogen werden

### Nissl-Färbung

Um das Ausmaß der NMDA-induzierten neuronalen Läsion bzw. die Gewebeschädigung durch die Operationsmethode selber (Kontrolle) visuell darstellen zu können, wird jeder dritte Objektträger einer Nissl-Färbung unterzogen. Diese spezielle histologische Färbetechnik dient der Darstellung des Nervengewebes. Aufgrund der basischen Struktur des verwendeten Oxazinfarbstoffs Kresylviolett werden negativ geladene Strukturen, also RNA und DNA, gefärbt. Da in den Nervenzellen die Zellorganellen nur in den Zellkörpern und nicht in den Axonen und Dendriten zu finden sind, handelt es sich um eine Zellkörperfärbung. Aufgrund des hohen RNA-Anteils treten die *Nucleoli* der Zellkörper blau hervor. Die für die Färbung charakteristischen Nissl-Schollen sowie die in den Zellkörpern enthaltene DNA werden blau-violett gefärbt. Als Nissl-Schollen bezeichnet man die für Neurone typische,

verdichtete Ansammlung an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER), welches die RNA enthält und der äußeren Kernmembran angelagert ist. Die Färbung der Gehirnschnitte erfolgt in speziellen Färbekästen (siehe 2.2.2) nach einem definierten Protokoll (Fitzpatrick und Hammond 2014). Der eigentlichen Färbung vorangestellt, erfolgt zunächst die Entfettung in Xylol (5 min) sowie die Rehydrierung der Gewebeschnitte. Hierfür werden diese in Ethanol-Wasser-Gemischen mit abnehmenden Konzentrationen an Alkohol (95 % und 70 % Ethanol) und schließlich in voll entsalztem (VE)-Wasser für jeweils 3 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Färbung in 0,1 %-iger Kresylviolett-Lösung (siehe 2.2.2). Die Inkubationszeit in der Färbelösung beträgt in Abhängigkeit der gewünschten Farbintensität 12 - 15 min. Zur Differenzierung der Färbung, dem Entfernen von Farbrückständen sowie zur Dehydrierung des Präparates werden die Gewebeschnitte nachfolgend zunächst für 3 min in VE-Wasser und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 min in 70 %, 1 min 95 % und kurzes Eintauchen in absoluten Ethanol) inkubiert. Zur Fixierung der Färbung werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 10 min in Xylol getaucht. Anschließend werden die Schnitte mit DPX Eindeckmedium (siehe 2.2.2) eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

### **3.5 Zellkultur primärer cerebellärer Granularzellen**

#### **3.5.1 Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Poly-L-Lysin (PLL)**

Um eine bessere Adhäsion der Zellen zu ermöglichen werden alle zur Kultivierung der primären Granularzellen verwendeten Zellkulturplatten und -schalen, sowie die Deckgläser mit PLL (siehe 2.2.4) beschichtet. PLL ist eine synthetische Verbindung, welche durch seine positive Ladung die elektrostatische Interaktion mit der negativ-geladenen Zellmembran erleichtert und so das Anwachsen der Zellen begünstigt. Dazu wird die PLL-Stocklösung (2,5 mg/ml) (siehe 2.2.4) unter der Sterilwerkbank mit sterilem dH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:25 verdünnt (Endkonzentration 0,1 mg/ml). Anschließend erfolgt die Beschichtung der Zellkulturplatten und -schalen in Abhängigkeit der Kultivierungsfläche mit 0,4 - 1,0 ml PLL-Lösung (siehe Tabelle 3.8). Für die Durchführung von IHC- bzw. IF-Färbungen (siehe 3.3.4, 3.3.5 und 3.3.6) werden in die 12-Wellplatte vor der Beschichtung einzelne Deckgläser (siehe 2.2.4) platziert. Um eine Kontamination sowie ein Austrocknen der Gefäße während der Beschichtung zu verhindern werden die Platten bzw. Schalen mit Parafilm (siehe 2.1.3) versiegelt. Anschließend werden sie lichtgeschützt mit Aluminiumfolie verpackt und über Nacht bei RT inkubiert.

Am zweiten Tag der Beschichtung wird die PLL-Lösung vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und es wird zweimal mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen (siehe Tabelle 3.8). Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Oberflächen der Zellkulturgefäße nicht austrocknen. Nach dem Waschvorgang wird mit Pen/Strep versetztes BME-Medium (siehe 2.2.4 und

Tabelle 3.8) in die Wells gegeben. Die Zellkulturplatten bzw. -schalen müssen für mindestens 2 h im Brutschrank vorinkubiert werden, bevor die Granularzellen ausgebracht werden können.

**Tabelle 3.8: Volumina für die Beschichtung/Kultivierung in Abhängigkeit des Zellkulturgefäßes**

Zellkulturgefäß	Volumen PLL-Lösung/dH <sub>2</sub> O/BME + Pen/Strep [ml]
24-Well Zellkulturplatte	0,4
12-Well Zellkulturplatte	0,5
35-mm Zellkulturschale	1,0
Ca <sup>2+</sup> -Messschälchen	1,0

### 3.5.2 Isolation primärer cerebellärer Granularzellen aus Mausgehirn

Zur Gewinnung primärer cerebellärer Granularzellen werden WT und Slack-KO Mäuse im Alter P 7 verwendet (siehe 3.1.3). Die Tötung der Versuchstiere erfolgt durch Dekapitation. Das Protokoll zur Durchführung der Präparation sowie der Kultivierung der cerebellären Granularzellen ist an die Arbeit von Krämer et. al angelehnt (Krämer und Minichiello 2010). Zu Beginn der Präparation (verwendete Materialien siehe 2.2.4) wird die Kopfhaut mit einer kleinen Schere in longitudinaler Richtung, beginnend an der Schädelbasis hin zur Nase verlaufend, aufgeschnitten und so der Schädel freigelegt. Anschließend wird die Schädeldecke eröffnet, indem der Schädel mit einer feinen Springschere beidseitig vom Ansatz der Ohrmuschel in Richtung Warzenteil bis hin zur Nase geöffnet wird. Mit einer gebogenen Pinzette kann nun die Schädeldecke abgenommen werden. Anschließend wird das Gehirn unter Zuhilfenahme eines Spatels entnommen und für die weitere Präparation in eine mit 15 ml eiskaltem HBSS befüllte Petrischale überführt. Unter der Stereolupe (siehe 2.1.1) wird nun das Cerebellum vorsichtig freipräpariert. Dabei wird dieses zunächst mit zwei feinen Pinzetten vom Großhirn sowie dem Mittelhirn separiert. Nachfolgend wird es von den anhaftenden Menigen und Gefäßen befreit und in eine frische mit eiskaltem HBSS gefüllte Petrischale überführt. Die gesammelten Cerebelli werden anschließend unter die Sterilwerkbank transferiert und dort in ein mit 10 ml HBSS gefülltes konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen (*Tube 1*) überführt. Nach 3-maligem Waschen des Gewebes mit je 10 ml HBSS erfolgt der Gewebeverdau. Die Menge an zugegebener Protease richtet sich dabei nach der Anzahl der präparierten Cerebelli. Bei einer Anzahl bis 6 Stück erfolgt die Digestion in einer Lösung aus 0,5 ml 2,5 %-igem Trypsin in 4,5 ml HBSS, bei mehr als 6 Cerebelli werden 0,7 ml 2,5 %-iges Trypsin zu 6,3 ml HBSS gegeben. Anschließend werden die Cerebelli für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird das *Tube* alle 2 - 5 min sanft geschwenkt. Die Trypsinierung des Gewebes wird durch Zugabe von 10 ml (< 6 Cerebelli) bzw. 14 ml Ausplattiermedium (> 6 Cerebelli) (siehe 2.2.4) abgestoppt. Die weitere Vereinzelung der Zellen erfolgt in zwei nachfolgenden Schritten. Nach Zugabe von 0,5 ml

1 %-iger DNase-Lösung werden die Cerebelli zusammen mit etwas Medium mit einer gestopften Pasteurpipette in ein frisches konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen (*Tube II*) überführt. Durch 10- bis 15-maliges durchziehen durch die Öffnung der Pipettenspitze wird die Dissoziation des Gewebes erreicht. Anschließend werden 10 ml Medium aus dem ersten Zentrifugenröhrchen (*Tube I*) zugegeben. Nach Sedimentation (2 min) der in der Zellsuspension vorhandenen Gewebefragmente wird der Überstand, welcher die losgelösten Zellen enthält, abgenommen. In einer geringen Menge Medium erfolgt nun die weitere Dissoziation der noch vorhandenen Gewebefragmente durch erneutes Auf- und Abpipettieren. Hierfür wird eine feuerpolierten Pasteurpipette mit verengter Pipettenöffnung verwendet. Anschließend werden 10 ml Medium aus dem *Tube I* dazugegeben. Durch erneute Sedimentation für 2 min werden die restlichen Gewebefragmente abgetrennt. Der Überstand mit der Zellsuspension wird in das *Tube I* überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wird der nun zellfreie Überstand mit einer 10 ml Stripette vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird in je 2 ml Ausplattiermedium pro Cerebellum aufgenommen. Nach Resuspension des Sediments erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer C-Chip-Zählkammer (siehe 2.1.3). Dazu wird zunächst eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension mit 0,4 %-iger Trypanblaulösung (siehe 2.2.4) hergestellt. Dadurch können die vitalen Zellen in der Suspension sichtbar gemacht werden. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden kann. Abgestorbene Zellen hingegen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen dadurch dunkelblau. Zur Herstellung der Verdünnung werden 20 µl Zellsuspension mit 30 µl Ausplattiermedium und 50 µl 0,4 %-ige Trypanblaulösung gemischt. Anschließend erfolgt die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl. Dazu werden 10 µl des Zellsuspension-Trypanblau-Gemischs auf die C-Chip-Zählkammer gegeben und die hell-erscheinenden Zellen in den jeweiligen Quadranten ausgezählt. Die anschließende Berechnung der Gesamtmenge an Zellen erfolgt anhand folgender Formel: Gesamtzellzahl [Zellen/ml] = Mittelwert Zellzahl [Zellen/0,01 mm<sup>3</sup>] x 5 (Verdünnungsfaktor) x 10<sup>4</sup>. Durch Zugabe von Ausplattiermedium wird eine Zellkonzentration von 1,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml bzw. 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Die gewählte Zellzahl ist abhängig von der Kultivierungsfläche der PLL beschichteten Zellkulturplatten bzw. -schalen. Die Auswahl des Kulturgefäßes findet in Abhängigkeit vom experimentellen Setup statt (siehe Tabelle 3.9). Beim Ausbringen der Zellen wird zunächst das auf den Zellkulturgefäßen befindliche BME-Medium mit einer 5 ml Stripette abgenommen und anschließend das entsprechende Volumen an Zellsuspension in die Wells bzw. auf die Schalen pipettiert. 24 h nach dem Ausplattieren wird das Ausplattiermedium durch frisches, 37 °C warmes Kultivierungsmedium ersetzt. Auch dabei wird zunächst das alte Medium mit Hilfe einer 5 ml Stripette entfernt. Anschließend werden die Zellen einmal mit 37 °C warmem PBS gewaschen, bevor frisches Medium zugegeben



wird. Die Zellen werden im Brutschrank für 7 Tage (DIV 7) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Während dieser Zeit wird alle 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wird die Hälfte des alten Mediums abgenommen und durch frisches, 37 °C warmes Medium ersetzt. Die Durchführung aller Experimente erfolgt an DIV 7.

**Tabelle 3.9: Verwendete Zellkulturgefäße und Zelldichten in Abhängigkeit des Experiments**

Dargestellt sind die Fläche der verwendeten Zellkulturgefäße, die Konzentration sowie die ausgebrachten Volumina der Zellsuspension und das Volumen an Kultivierungsmedium

Experiment	Zellkulturgefäß	Kultivierungsfläche [cm <sup>2</sup> ]	Konzentration Zellsuspension [Zellen/ml]	Volumen Zellsuspension/ Medium [ml]	Zellzahl
Exzitotoxizitätsversuch	24-Well Zellkulturplatte	1,9	1,5 x 10 <sup>6</sup>	0,4	6 x 10 <sup>5</sup>
RNA-Isolation	24-Well Zellkulturplatte	1,9	1,5 x 10 <sup>6</sup>	0,4	6 x 10 <sup>5</sup>
Proteinisolation	35-mm Zellkulturschale	9,0	1,5 x 10 <sup>6</sup>	2,0	3 x 10 <sup>6</sup>
Immunfärbung	24-Well Zellkulturplatte	1,9	1,5 x 10 <sup>6</sup>	0,4	6 x 10 <sup>5</sup>
Ca <sup>2+</sup> -Messung	Ca <sup>2+</sup> -Messschälchen	8,9	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,0	1 x 10 <sup>6</sup>

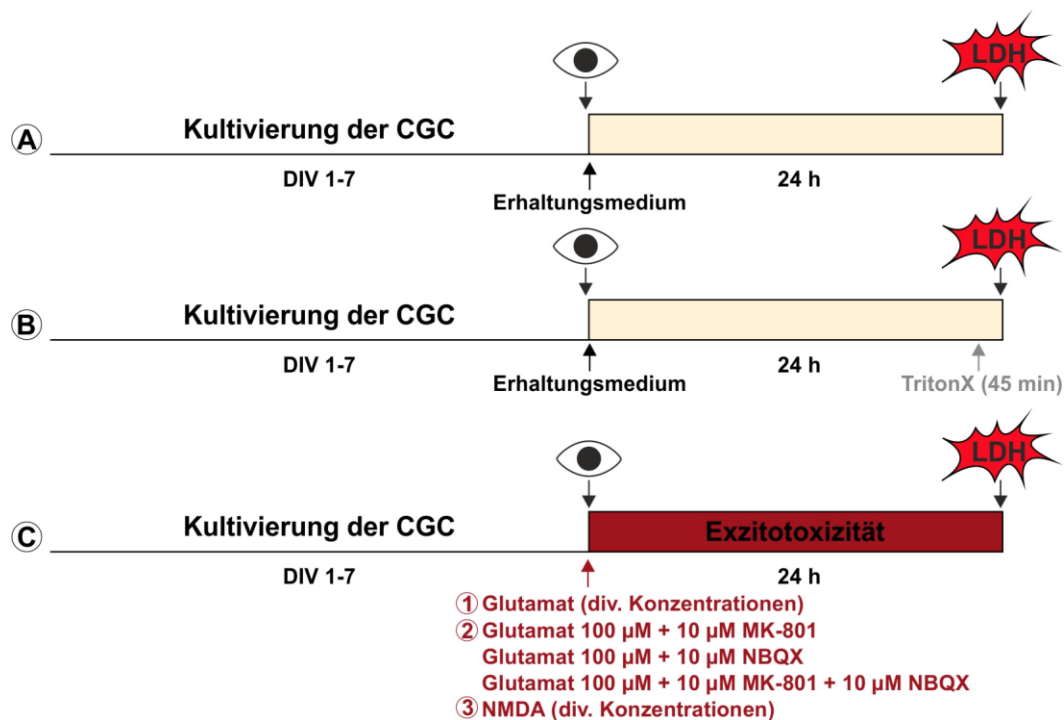
### 3.6 Exzitotoxizitätsstudien

Alle Exzitotoxizitätsexperimente werden unter Verwendung von primären WT bzw. Slack-KO Granularzellkulturen (DIV 7), welche auf 24-Wellplatten in einer Zelldichte von 0,6 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Well ausgebracht wurden, durchgeführt. Ziel der Versuche ist es den Einfluss von Slack auf die Schädigungsmechanismen während exzitotoxischer Stimulation zu untersuchen. Dazu werden die Kulturen für 24 h mit verschiedenen exzitotoxischen Substanzen (Glutamat und NMDA, siehe 3.6.1) inkubiert. Nachfolgend erfolgt die Bestimmung des induzierten Zelltods mittels Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay (siehe 3.6.2). Vor Versuchsbeginn müssen alle Kulturen mikroskopisch begutachtet werden, um die Vitalität der Zellen sowie eine vergleichbare Konfluenz der Platten zu gewährleisten. Um eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Kulturen untereinander zu ermöglichen und den Einfluss natürlicher Differenzen in der Zelldichte sowie der Vitalität der Zellen auf das Versuchsergebnis zu minimieren, werden von jeder Kondition technische Triplikate angefertigt.

#### 3.6.1 Untersuchung des Einflusses von Slack auf die Exzitotoxizität

Die Durchführung der verschiedenen Exzitotoxizitätsstudien ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Vor Versuchsbeginn werden zunächst die Glutamat- bzw. NMDA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Dazu wird die jeweilige Stocklösung (siehe

2.2.5) mit Erhaltungsmedium entsprechend der Berechnungen in Abschnitt 2.2.5 (Verdünnungsreihe Glutamat/NMDA) verdünnt. Für einige Versuchsansätze werden zudem Glutamat-Lösungen die einen NMDA- und/oder AMPA-Rezeptorantagonisten enthalten vorbereitet (siehe 2.2.5). Anschließend wird das Medium von jeweils 3 Wells mit einer 1 ml Pipette vorsichtig abgenommen und es werden je 600 µl einer (exzitotoxischen) Lösung zugegeben. Um ein Absterben der Zellen durch Zellstress und Scherkräfte zu vermeiden gibt man die Lösung langsam und behutsam am Rand des Wells zu. Nach Inkubation der Zellkulturplatten für 24 h im Brutschrank wird das Ausmaß an Zelltod untersucht, indem die Menge an freigesetzter LDH aus dem Zellkulturüberstand bestimmt wird (siehe 3.6.2). Für jeden Versuch werden jeweils eine Vitalkontrolle sowie eine maximale Zelltodkontrolle mitgeführt. Für die Vitalkontrolle werden die Zellen ausschließlich mit Erhaltungsmedium inkubiert. Um die von der Zellzahl abhängige maximal mögliche LDH-Freisetzung (Totkontrolle) bestimmen zu können, werden 45 min vor Versuchsende 60 µl Lyse-Lösung zu 540 µl Medium zugegeben.



#### Abbildung 3.4: Versuchsdurchführung der verschiedenen Exzitotoxizitätsstudien

Dargestellt sind die unterschiedlichen Versuchsansätze der verschiedenen Exzitotoxizitätsstudien. Um die basale LDH-Freisetzung (Vitalkontrolle) zu bestimmen erfolgt die Versuchsdurchführung wie in **A** gezeigt. Dazu werden die CGC-Kulturen für 24 h mit frischem Erhaltungsmedium inkubiert. Um die maximale LDH-Freisetzung zu bestimmen werden die Kulturen wie in **B** dargestellt ebenfalls für 24 h mit frischem Erhaltungsmedium inkubiert. 45 min vor Versuchsende wird eine Triton X-Lösung zur vollständigen Zellyse zugegeben. **C** zeigt die Durchführung der verschiedenen Exzitotoxizitätsbedingungen. Die Expositionsdauer der GluR-Agonisten ± GluR-Antagonist beträgt jeweils 24 h.

### **Exzitotoxischer Einfluss von Glutamat**

Zur Untersuchung des neurotoxischen Einflusses von Glutamat auf die primären Granularzellen werden folgende Glutamatkonzentrationen verwendet: 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  (Pipettierschema siehe Abbildung 3.6 A).

### **Exzitotoxischer Einfluss der unterschiedlichen Glutamatrezeptoren**

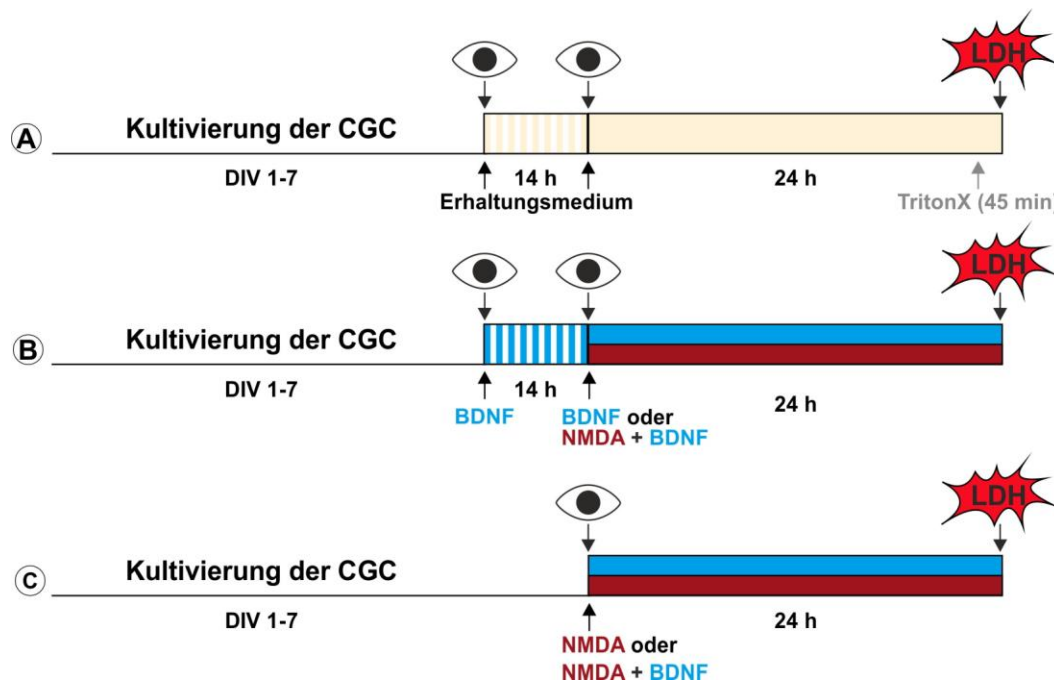
Zur Differenzierung der AMPA- bzw. NMDA-Rezeptor-vermittelten exzitotoxischen Neuronenschädigung nach Glutamatstimulation werden die CGC-Kulturen einerseits mit Glutamat, und andererseits mit einer Kombination aus Glutamat und einem AMPA- bzw. NMDA-Rezeptorblocker (NBQX respektive MK-801) oder entsprechender Dreierkombination aus Glutamat mit einem AMPA- sowie NMDA-Rezeptorblocker, behandelt (Pipettierschema siehe Abbildung 3.6 B). Folgende Konzentrationen werden verwendet: Glutamat 100  $\mu\text{M}$  bzw. Glutamat 100  $\mu\text{M}$  in Kombination mit 10  $\mu\text{M}$  MK-801 und/oder 10  $\mu\text{M}$  NBQX.

### **Exzitotoxischer Einfluss von NMDA**

Zur genaueren Untersuchung des neurotoxischen Einflusses von NMDA auf die primären Granularzellen werden diese analog zur in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Vorgehensweise mit folgende NMDA-Konzentrationen inkubiert: 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  (Pipettierschema siehe Abbildung 3.6 C).

### **Einfluss von BDNF auf die NMDA-induzierte Exzitotoxizität**

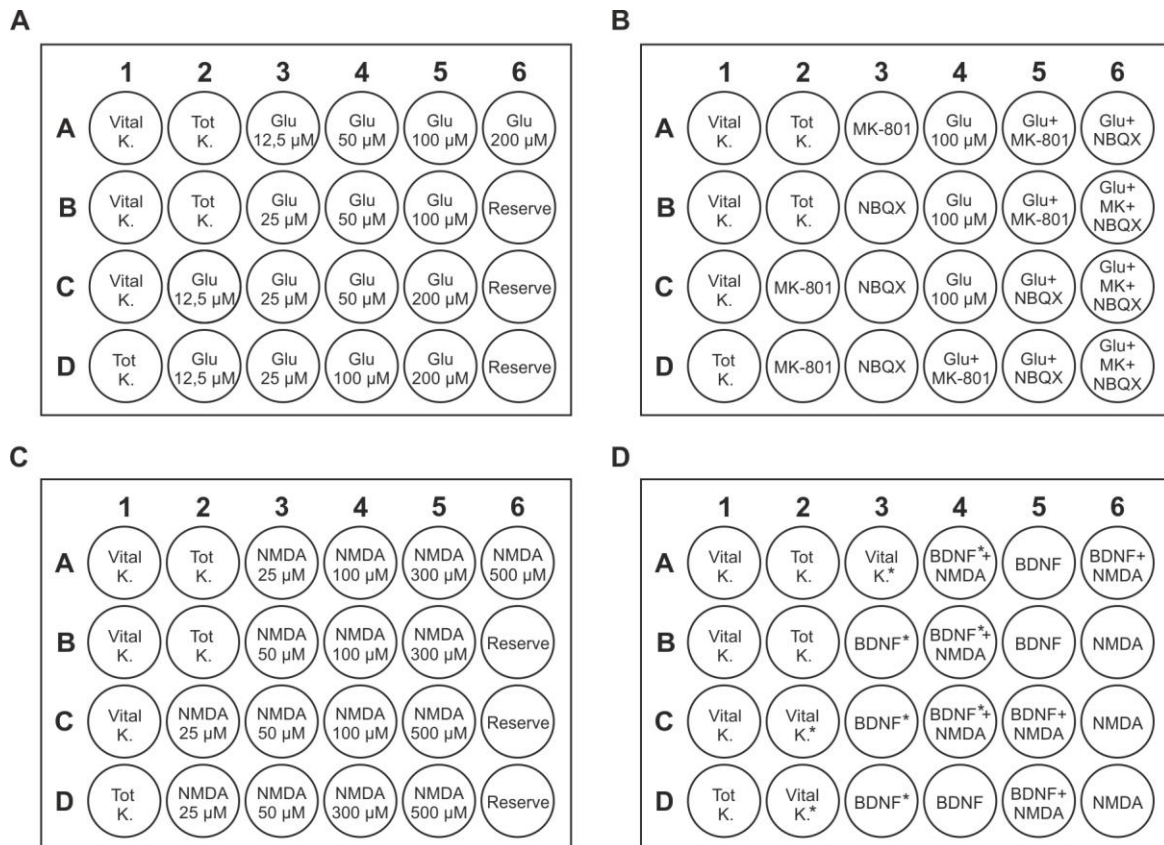
Aufgrund der postulierten neuroprotektiven Wirkung bei Exzitotoxizität (Lindholm et al. 1993, Beck et al. 1994, Han und Holtzman 2000, Almeida et al. 2005, Liao et al. 2010) sollte der Einfluss des Wachstumsfaktors BDNF auf das Überleben cerebellärer Granularzellen nach Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung für 24 h untersucht werden. Dazu erfolgt die Co-Applikation von BDNF und NMDA. Bezüglich des Zeitpunktes sowie der Dauer der BDNF-Zugabe werden in der Fachliteratur kontroverse Angaben gemacht (Lindholm et al. 1993, Cheng und Mattson 1994, Brandoli et al. 1998, Marini et al. 1998, Sato et al. 2001, Jiang et al. 2003, Caldeira et al. 2007). Daher wurden zwei unterschiedliche Versuchsschemata durchgeführt. Dabei wird der Einfluss einer 1.) BDNF-Präkonditionierung vor Beginn der NMDA-Exzitotoxizität und 2.) Co-Applikation von BDNF auf das neuronale Überleben bei gleichzeitiger Applikation von NMDA untersucht (Versuchsdurchführung siehe Abbildung 3.5 und Pipettierschema siehe Abbildung 3.6 D).



**Abbildung 3.5: Versuchsdurchführung der NMDA-Exzitotoxizität in Abhängigkeit der Co-Stimulation mit BDNF**

Dargestellt sind die zeitlichen Versuchsabläufe der NMDA-Exzitotoxizitätsstudien  $\pm$  BDNF. **A - C** Die gestreiften Balken symbolisieren die 14-stündige Präinkubation mit den jeweils dargestellten Lösungen. Um die basale LDH-Freisetzung (Vitalkontrolle) zu bestimmen werden die CGC-Kulturen wie in **A** gezeigt mit frischem Erhaltungsmedium inkubiert. Zur Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung wird 45 min vor Versuchsende eine Triton X-Lösung zur vollständigen Zellyse zugegeben. **B** zeigt die Durchführung der BDNF-Präinkubation (14 h). Die nachfolgende Expositionsdauer von BDNF  $\pm$  NMDA betrug jeweils 24 h. In **C** ist die Inkubation mit NMDA  $\pm$  BDNF für 24 h dargestellt.

Für die erste Versuchsreihe werden die Kulturen an Versuchstag 1 (DIV 6, 14 h vor NMDA-Applikation) mit 400  $\mu$ l BDNF-Lösung (50 ng/ml) präinkubiert. An Versuchstag 2 (DIV 7) erfolgt dann die Zugabe von je 200  $\mu$ l NMDA-Lösung (900  $\mu$ M, siehe 2.2.5) pro Well. Für die zweite Versuchsreihe wird BDNF zeitgleich mit 600  $\mu$ l NMDA-Lösung (300  $\mu$ M, siehe 2.2.5) appliziert. Die Konzentration an BDNF im Medium beträgt erneut 50 ng/ml. Darüber hinaus wird der Einfluss von BDNF auf die Vitalität der Neurone unter Kultivierungsbedingungen, also ohne exzitatorischen NMDA-Stimulus, untersucht. Hierfür werden die Zellen einerseits an DIV 6 mit BDNF (400  $\mu$ l, 50 ng/ml) für 14 h präinkubiert, bevor dann an DIV 7 200  $\mu$ l Erhaltungsmedium mit 50 ng/ml BDNF zugegeben werden. Alternativ wird BDNF (600  $\mu$ l, 50 ng/ml) an DIV 7 zu den Zellen gegeben. Auch wird untersucht, ob die Inkubation der Zellen mit geringerem Volumen an Medium (400  $\mu$ l statt 600  $\mu$ l) für 14 h einen Einfluss auf das Zellüberleben hat. Dazu werden die Zellen ab DIV 6 ebenfalls 14 h lang mit 400  $\mu$ l Erhaltungsmedium kultiviert bevor dann an DIV 7 nochmals 200  $\mu$ l Medium zugegeben werden (Pipettierschema siehe Abbildung 3.6 D).



**Abbildung 3.6: Pipettierschemata zur Untersuchung der Exzitotoxizität**

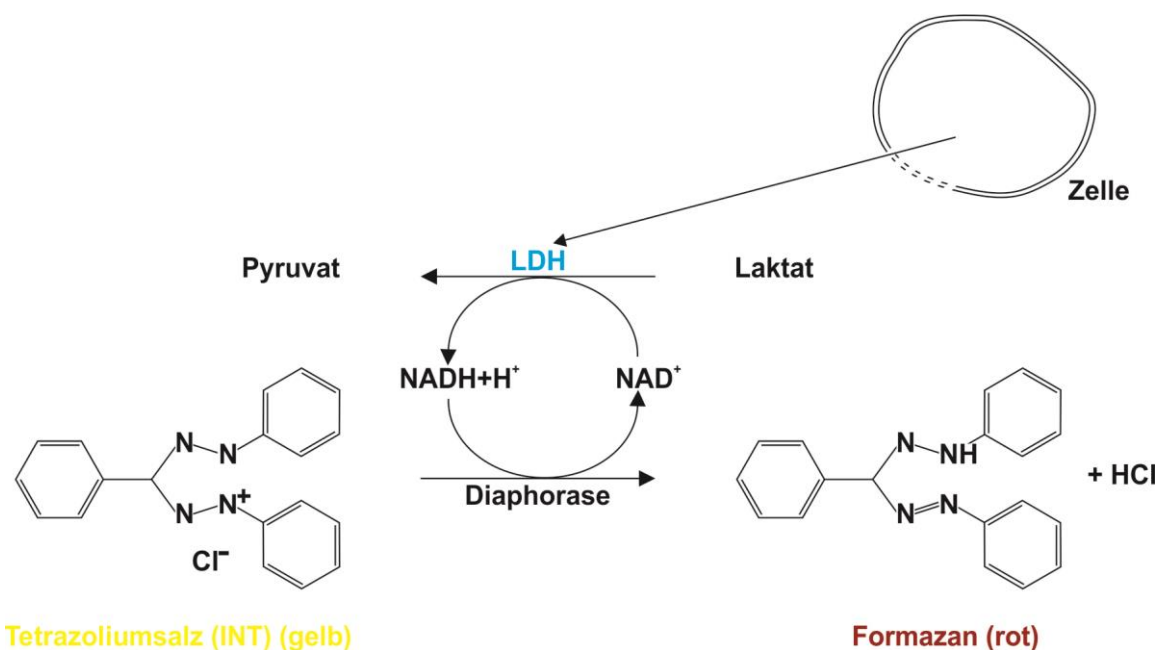
**A** Pipettierschema zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Toxizität von Glutamat. **B** Pipettierschema zur Ermittlung des Beitrags von AMPA-/NMDA-Rezeptoren an der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität. **C** Pipettierschema zur Untersuchung der NMDA-Rezeptor abhängigen Exzitotoxizität. **D** Pipettierschema zur Untersuchung des Einflusses von BDNF auf die NMDA-Exzitotoxizität. (\*) entsprechen der Präinkubation für 14 h mit entweder Erhaltungsmedium oder Erhaltungsmedium + BDNF.

### 3.6.2 Bestimmung der LDH-Aktivität

Der Verlust der Integrität von Zellmembranen ist ein verlässlicher Marker von v. a. nekrotischem Zelltod. Hierbei kommt es u. a. zur Freisetzung des sonst cytosolisch lokalisierten Enzyms LDH. Unter Zellkulturbedingungen kann der Anstieg der LDH im umgebenden Medium gemessen werden. Die LDH ist in nahezu allen Zellen vorhanden, und essenziell für den terminalen Schritt der anaeroben Glykolyse. Dabei katalysiert sie unter physiologischen Bedingungen die enzymatische Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Im Gegenzug kommt es zur Oxidation von NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>, welches während der Glykolyse von der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zur Energiegewinnung in Form von ATP benötigt wird.

Im Verlauf der exzitotoxischen Schädigung der Neurone wird die LDH ins Medium abgegeben. Nachfolgend kann in einer kolorimetrischen Messung, unter Verwendung des *CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assays* der Firma Promega (siehe 2.2.5), die Konzentration der freigesetzten LDH bestimmt werden. Die gemessene Farbintensität ist

dabei direkt proportional zur LDH-Aktivität und somit zur Dimension des Zelltods in einer Zellkulturschale. Das Prinzip der Messung ist in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt. Der im Kit mitgelieferte Substrat-Mix enthält neben dem Enzym Diaphorase das Tetrazoliumsalsz Londonitrotetrazolium-Violett (INT) sowie Laktat. Das im Überschuss vorhandene Laktat bewirkt, dass die oben beschriebene enzymatische Pyruvat-Laktat-Reaktion in entgegengesetzter Richtung verläuft. So katalysiert die im Zellkulturüberstand enthaltene LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Gleichzeitig kommt es zur Reduktion des Co-Faktors  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  wodurch die enzymatische Umsetzung von INT zu einem roten Formazansalz ermöglicht wird. Die Menge an Formazan wird photometrisch quantifiziert und ist direkt proportional zur LDH-Aktivität.



### Abbildung 3.7: Prinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung

Die LDH katalysiert die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat. Dabei wird der Co-Faktor  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert. Parallel dazu katalysiert das Enzym Diaphorase eine Redoxreaktion in der gelbes Tetrazoliumsalsz (INT) zu rotem Formazan reduziert wird, während  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Das entstandene Formazan kann anschließend photometrisch quantifiziert werden.

### Probennahme und Bestimmung der LDH

Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgt nach 24 h Exzitotoxizität. Das Protokoll zur Probennahme, Durchführung und Messung der Enzymaktivität orientiert sich stark an den Angaben des Herstellers (Promega). Für jede Kondition wird die freigesetzte Menge an LDH aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. Die generelle LDH-Aktivität unter Kultivierungsbedingungen wird aus dem Überstand unbehandelter Kulturen ermittelt. Um die maximale LDH-Konzentration bestimmen zu können, wird 45 min vor Versuchsende eine Triton X-haltige Lyse-Lösung zu den bis dato ebenfalls unbehandelten Kulturen zugegeben. Von jeder Kondition werden jeweils 500  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstands abgenommen und in

Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Um im Medium enthaltene Zelltrümmer abzutrennen, wird für 4 min bei 250 x g zentrifugiert. Anschließend werden 400 µl des Überstands abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches bis zur Bestimmung der LDH-Aktivität auf Eis gelagert wird. Die Proben zur Bestimmung der maximalen LDH-Konzentration werden mit Erhaltungsmedium 1:5 verdünnt. Um die spätere Quantifizierung der LDH-Aktivität zu ermöglichen, wird zunächst eine Verdünnungsreihe aus der im Kit enthaltenen LDH-Positivkontrolle (siehe 2.2.5) erstellt. Dazu wird durch Zugabe von 1 µl LDH-Positivkontrolle zu 5 ml equilibriertem Zellkulturmedium eine Stammlösung mit einer Aktivität von 800 U/ml hergestellt. Anschließend wird diese im Verhältnis 1:2 weiter verdünnt, wodurch sich Verdünnungen mit einer Aktivität von 400 U/ml, 200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml, sowie 25 U/ml ergeben. Für einige Versuche wird zusätzlich eine Verdünnung mit einer Aktivität von 600 U/ml erstellt. Nachfolgend erfolgt die Durchführung des eigentlichen LDH-Assays. Hierfür werden Erhaltungsmedium als Nullabgleich (*Blank*), die LDH-Verdünnungsreihe für die Erstellung einer Standardkurve sowie alle Proben in eine 96-Wellplatte pipettiert. Das Auftragevolumen beträgt jeweils 50 µl. Es werden für alle Konditionen Duplikate pipettiert. Anschließend werden je 50 µl Substrat-Mix zu jedem Ansatz gegeben. Nach Inkubation für 30 min bei RT unter lichtgeschützten Bedingungen werden je 50 µl einer Stopp-Lösung (1 M Essigsäure) zu jedem Ansatz pipettiert um die Umwandlung des Substrats abzustoppen. Nun wird mittels ELISA-Reader (siehe 2.1.1) die Absorption bei 492 nm gemessen und so die Menge an gebildetem Formazan für jede Kondition photometrisch ermittelt. Die Auswertung des Assays erfolgt mit Hilfe der Software Magellan 7 (siehe 2.1.2) von Tecan. Dabei wird zunächst aus den Absorptionswerten der Verdünnungsreihe der LDH-Positivkontrolle eine LDH-Standardkurve erstellt. Anhand dieser kann dann die gemessene Absorption jeder Probe in die tatsächliche LDH-Aktivität umgerechnet werden. Die *Blank*-Werte (nur Erhaltungsmedium) müssen zuvor von allen Absorptionswerten subtrahiert werden. Anschließend wird der Mittelwert aus den Duplikaten einer jeden Probe gebildet. Die Berechnung der relativen LDH-Aktivität [%], stellvertretend für das Ausmaß des neuronalen Zelltods, erfolgt durch Quotientenbildung der LDH-Aktivität der einzelnen Proben zur maximalen LDH-Aktivität nach Lyse der Zellen mit Triton X.

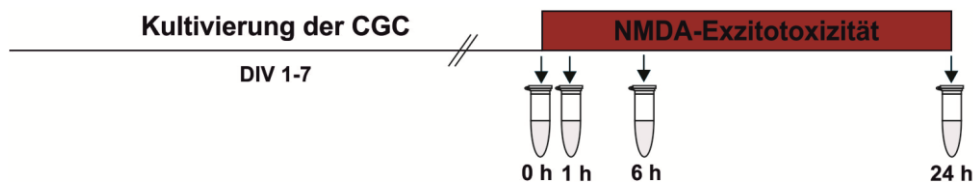


### 3.7 RNA-Analytik

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion aller RNA-Analytik-Experimente dienen cerebelläre Granularzellen (siehe 3.5). Die Zelldichte beträgt für alle Experimente  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Das Zellkulturgefäß zur Kultivierung der Zellen wird entsprechend der späteren Verwendung der isolierten RNA ausgewählt (siehe Abschnitt 3.5.2, Tabelle 3.9). Zur Extraktion der RNA für qRT-PCR Experimente (siehe 3.7.3) werden die Zellen auf 12-Wellplatten ausgebracht. Um eine Kontamination der Proben mit RNAsen zu vermeiden wird der Arbeitsplatz vor jedem Arbeitsschritt gründlich mit 80 %-igem Ethanol gereinigt. Für die Aufbereitung sowie Verdünnung der Proben wird aus selbigem Grund ausschließlich DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet.

#### 3.7.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus den CGC-Kulturen erfolgt an DIV 7. Damit analysiert werden kann, ob sich die Expressionslevel bestimmter Zielgene durch die NMDA-Exzitotoxizität verändern, wird ein Teil der Kulturen mit einer 300  $\mu$ M NMDA-Lösung (siehe 2.2.5) inkubiert. Um die zeitabhängige Regulierung der Expression zu berücksichtigen, erfolgt die RNA-Isolierung an vier verschiedenen Zeitpunkten der NMDA-Inkubation. Die Durchführung des Versuchs ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt. Dabei erfolgt die RNA-Isolierung vor der NMDA-Applikation (0 h, Basal), nach 1 h, 6 h und 24 h NMDA-Stimulation.



**Abbildung 3.8: Versuchsdurchführung RNA-Extraktion**

An DIV 7 erfolgt die Induktion der Exzitotoxizität mit 300  $\mu$ M NMDA-Lösung für maximal 24 h. Dabei werden vor Beginn der NMDA-Zugabe (0 h, Basal), nach 1 h, 6 h und 24 h NMDA-Inkubation RNA-Proben extrahiert.

#### Isolierung und Aufreinigung der RNA

Die Isolierung der RNA wird mit Hilfe des *NucleoSpin*<sup>®</sup> Kits (Macherey Nagel, siehe 2.2.6) durchgeführt. Die Durchführung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Nach der vollständigen Abnahme des Zellkulturüberstands (Erhaltungsmedium oder NMDA-Lösung) erfolgt die Lyse der Zellen. Dazu werden 350  $\mu$ l des Zell-Lyse-Mix zu jedem Isolationsansatz zugegeben. Der Zell-Lyse-Mix enthält eine große Menge an chaotropen Salzen, wodurch eine sofortige Inaktivierung vorhandener RNAsen gewährleistet wird. Zudem wird dadurch die spätere Adsorption der RNA an einer Silikamembran begünstigt. Nach vollständiger Lyse der Zellen, welche durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des zugefügten Zell-Lyse-Mix



garantiert wird, werden die gewonnenen Lysate in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Extraktion können sie für maximal ein halbes Jahr bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

Im nächsten Schritt der Isolierung erfolgt die Filtration der Lysate. Dies ist notwendig um das Lysat zu reinigen und dessen Viskosität zu verringern. Dazu werden die *NucleoSpin*<sup>®</sup> Filter (violetter Ring) auf ein 2 ml Auffanggefäß gesteckt und nach Applikation der Proben auf die Filter wird für 1 min bei RT und 11.000 rcf zentrifugiert. Der Durchlauf wird mit 350  $\mu\text{l}$  70%-igem Ethanol (siehe 2.2.6) versetzt und durch Pipettieren vermengt, wodurch die Bindungseigenschaften der RNA optimiert werden. Anschließend wird die Mischung auf die *NucleoSpin*<sup>®</sup> RNA-Säulen (blauer Ring) gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 30 sec bei RT und 11.000 rcf kann der Durchfluss verworfen werden. Die im Lysat vorhandene RNA bindet an die Silikamembran der Säule. Durch Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  MDB-Puffer wird die Silikamembran entsalzen. Dies wirkt sich positiv auf den nachfolgenden rDNase Verdau aus. Nach Zentrifugation der Säulen (RT, 30 sec, 11.000 rcf) wird der Durchfluss erneut verworfen und es werden 100  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus 10  $\mu\text{l}$  rDNase und 90  $\mu\text{l}$  rDNase-Reaktionspuffer auf die Säulen gegeben. Anschließend wird für 15 min bei RT inkubiert, um einen kompletten DNase-Verdau der an die Silikamembran gebundenen DNA zu gewährleisten. Um den DNase-Verdau abzustoppen wird RA2-Puffer dazugegeben und erneut für 30 sec bei RT und 11.000 rcf zentrifugiert. Anschließend folgen zwei Waschschrte mit 600  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  RA3-Puffer. Dabei werden Salze, Metabolite und makromolekulare Zellbestandteile entfernt. Nach dem ersten Waschschrte wird bei RT und 11.000 rcf für 30 sec, nach dem zweiten für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. Im letzten Extraktionsschrte erfolgt die Elution der gereinigten RNA. Dazu wird 50  $\mu\text{l}$  RNase-freies DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  auf die Membran gegeben und für 1 min bei RT und 11.000 rcf zentrifugiert. Die eluierte RNA wird auf Eis gelagert und die jeweilige Konzentration am Nanophotometer (siehe 2.1.1) bestimmt und mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  auf eine Konzentration von 25 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

### 3.7.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wird unter Verwendung des *iScript cDNA Synthesis Kits* (Bio-Rad) (siehe 2.2.6) durchgeführt. Die im Kit enthaltene Reverse Transkriptase (RT) ermöglicht via RT-PCR die Synthese der cDNA aus der isolierten und gereinigten RNA. Dazu wird für die Anzahl an umzuschreibenden RNA-Proben zunächst ein +RT-cDNA-Synthese-Reaktionsansatz (Mastermix) (siehe 2.2.6) ohne RNA hergestellt. Dieser enthält neben der RT, den *5x iScript-Mix*. Dieser *iScript-Mastermix* wird mit der entsprechenden RNA in ein PCR-*Tube* pipettiert. Zudem wird für jede Probe der gleiche Versuchsansatz ohne RT hergestellt (-RT-cDNA-Synthese), welche stattdessen durch DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  ersetzt wird. Die

dadurch erzeugte -RT-cDNA dient als Negativkontrolle bei der späteren qRT-PCR. Im Anschluss erfolgt die reverse Transkription der RNA in einem Thermocycler nach einem definierten Temperaturprotokoll (siehe Tabelle 3.10). Im ersten Syntheseschritt bei 25 °C für 5 min erfolgt die Anlagerung der im Kit enthaltenen Primer (Oligo-dT-Nukleotide und Random-Hexamer-Oligonukleotide) an die RNA. Dabei wird mittels RNA-abhängiger DNA-Polymeraseaktivität der RT ein, zum RNA-Strang komplementärer DNA-Hybridstrang synthetisiert. Anschließend wird die Probe für 30 min auf 42 °C erhitzt. Dabei erfolgt mittels RNase-H+-Aktivität der RT zunächst der Abbau des RNA-Strangs. Nachfolgend wird dann durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der RT ein komplementärer DNA-Strang zu dem bereits bestehenden Einzelstrang synthetisiert. Durch Erhitzen der Probe auf 85 °C für 5 min wird die RT inaktiviert. Im Anschluss an die Synthese werden die cDNA-Proben mit DEPC-H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:7,5 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 3.10: PCR-Programm für die cDNA-Synthese**

**PCR-Programm**

Primeranlagerung	25 °C	5 min
Reverse Transkription	42 °C	30 min
Inaktivierung RT	85 °C	5 min
Hold	4 °C	

### 3.7.3 RNA-Analytik mittels qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die zeitgleich die fluorezenzbasierte Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte ermöglicht. So wird während eines qRT-PCR-Laufs parallel zu jedem PCR-Zyklus eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an gebildeten PCR-Produkten zu (Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993, Wittwer et al. 1997). Die Generierung der Primer (siehe 2.2.6) wird mit Hilfe den Online-Softwareprogrammen Primer 3 und Primer-BLAST (siehe 2.1.2) durchgeführt. Für das Primerdesign wurden folgende Bedingungen festgelegt: Primerlänge  $\leq 23$  bp, Schmelztemperatur zwischen 58 °C und 64 °C, Fragmentgröße zwischen 70 bp und 120 bp. Vor Beginn der eigentlichen PCR wird zunächst für jedes Primerpaar ein Reaktionsansatz ohne cDNA (Mastermix) für die entsprechende Anzahl der Proben hergestellt. Dafür werden die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit dem *SsoAdvanced Universal SYBR<sup>®</sup>Green Supermix* gemischt (siehe 2.2.6). Dieser enthält neben dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR<sup>®</sup>Green*, eine *Antibody-mediated hot-start Sso7d Fusion Polymerase*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, spezielle Puffersysteme und Stabilisatoren, sowie eine Mischung aus den passiven Referenzfarbstoffen ROX und Fluoreszein. Beim Pipettieren der PCR werden zunächst je 12 µl des Mastermix pro

Versuchsansatz (Well einer 96-Lochplatte) vorgelegt, anschließend werden je 3 µl cDNA dazugegeben. Für jede +RT-cDNA-Probe werden drei technische Replikate angefertigt, von der Negativkontrolle (–RT-cDNA-Probe) lediglich ein Unikat. Die qRT-PCR findet in einem Thermocycler (CFX Connect, Bio-Rad, siehe 2.1.1) statt, wobei ein spezifisches Temperaturprotokoll verwendet wird (siehe Tabelle 3.11). Zu Beginn erfolgt der sogenannte *Antibody-mediated hot-start*. Durch Erhitzen der Probe bei 95 °C für 2 min kommt es durch die Denaturierung der an das aktive Zentrum des Enzyms gebundenen Antikörper zur Aktivierung der DNA-Polymerase. Anschließend läuft das eigentliche PCR-Programm ab. Während der sogenannten Denaturierungsphase (95 °C) erfolgt der Aufbruch der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Helices, wodurch die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge während der Hybridisierungsphase (*Annealingphase*, 58 °C) ermöglicht wird. In der darauffolgenden Elongationsphase (58 °C) werden die neu generierten DNA-Stränge durch freie Nukleotide komplementiert. Der im Kit enthaltene Fluoreszenzfarbstoff *SYBR<sup>®</sup>Green* bindet mit hoher Affinität an die DNA-Doppelstränge, wodurch es zur 1000-fachen Zunahme des Fluoreszenzsignals kommt. Die Menge an gebildetem Produkt nimmt mit jedem Amplifikationszyklus exponentiell zu und kann anhand der dazu proportionalen Zunahme der Fluoreszenz in Echtzeit bestimmt werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff jedoch auch mit unspezifischen DNA-Fragmenten interkaliert, muss nach Ablauf der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur (58 °C bis 95 °C) wird ein Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA (dsDNA) erreicht. Bei einer für das jeweilige PCR-Produkt spezifischen Schmelztemperatur kommt es zur Denaturierung des Doppelstrangs, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigegeben wird. Dadurch kann eine Änderung des Fluoreszenzsignals registriert werden. Die Schmelzkurve und -temperatur hängen von der Länge sowie der Basenzusammensetzung des jeweiligen dsDNA-Fragmentes ab. Anhand der Schmelztemperatur kann daher auf die Fragmentlänge der gebildeten PCR-Produkte und somit auf die Spezifität des im Verlauf der qRT-PCR detektierten Signals rückgeschlossen werden. Die quantitative Auswertung der qRT-PCR erfolgt nach Ende eines Laufs anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale. Dazu wird die Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenzahl aufgetragen, wodurch sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf ergibt. Die Quantifizierung erfolgt zum Zeitpunkt des Übergangs in die exponentielle Phase (*cycle threshold*, Ct-Wert). Dies stellt den Schwellenwert dar, an dem das spezifische Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant übersteigt. Neben dem Ct-Wert für das Zielgen, wird immer ein Ct-Wert für ein sogenanntes Referenzgen (*housekeeping gene*) bestimmt. Dieses wird im Gegensatz zu den regulierten Genen unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und den äußeren Einflüssen exprimiert. Die für jedes Gen ermittelten Expressionslevel der mRNA werden dann relativ zur Expression des

Referenzgens angegeben. Hierzu wird zunächst der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert durch Subtraktion der jeweiligen Ct-Werte ( $\text{Ct (Referenz)} - \text{Ct (Zielsequenz)}$ ) ermittelt. Die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte können unter der Annahme, dass sich die cDNA-Menge während jedem Zyklus verdoppelt, mit Hilfe folgender Formel in eine relative Expression umgerechnet werden:  $\text{Relative Expression} = 2^{(\text{Ct (Referenz)} - \text{Ct (Zielsequenz)})}$ . Ein Teil der Proben kann nach erfolgreicher qRT-PCR in einem 3 %-iges Agarosegel aufgetrennt werden (Probenvolumen pro Tasche: 15  $\mu\text{l}$  Probe + 3  $\mu\text{l}$  Dye) (siehe 2.2.6). Anhand der entstandenen Fragmente kann eine Kontamination durch genomische DNA ausgeschlossen und die Primerspezifität überprüft werden.

**Tabelle 3.11: Programm für die qRT-PCR**

qRT-PCR-Programm	Temperatur	Dauer	
Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	2 min	
Denaturierungsphase	95 °C	5 sec	40 Zyklen
Hybridisierungs- und Elongationsphase	58 °C	20 sec	
Fluoreszenzmessung			
Erstellung der Schmelzkurve: Erhitzen in 0,5 °C Schritten	58 °C-95 °C	alle 5 sec	

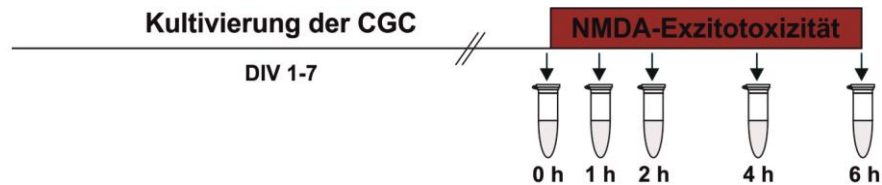
### 3.8 Proteinbiochemische Methoden

Für die Proteinextraktion werden cerebelläre Granularzellen wie in Abschnitt 3.5 beschrieben isoliert und kultiviert. Die Zelldichte beträgt  $3 \times 10^6$  pro 6-Wellplatte bzw. 35-mm Schale (siehe Abschnitt 3.5.2, Tabelle 3.9). Um den Einfluss von Slack auf die Expression und Phosphorylierung bestimmter Proteine während der NMDA-Exzitotoxizität zu untersuchen, werden die CGC-Kulturen an DIV 7 zunächst für 1 h, 2 h, 4 h und 6 h mit je 1 ml 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung (siehe 2.2.5) inkubiert und anschließend lysiert. Nachfolgend werden die in den extrahierten Zelllysaten vorhandenen Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt und im Western Blot (WB)-Verfahren auf Membrane transferiert. Anschließend werden diese mit verschiedenen Antikörpern (siehe 2.2.7) inkubiert, um die Proteinexpression und -phosphorylierung einer bestimmten Zielstruktur nachweisen und quantifizieren zu können.

#### 3.8.1 Proteinextraktion

Zunächst wird das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und die Kulturen werden mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden je 200  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (siehe 2.2.7) zu jedem Versuchsansatz zugegeben und es wird unter gelegentlichem Schwenken der Zellkulturplatte für 5 min auf Eis inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Lysats wird eine vollständige Lyse der Zellen gewährleistet, bevor die Proteinlysate in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Durch die anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rcf für 15 min werden Zelltrümmer abgetrennt. Nachfolgend wird der

Überstand mit Hilfe eines VivaSpin 500 Zentrifugalkonzentrators (siehe 2.2.7) auf ein Volumen von ca. 100 µl aufkonzentriert (15.000 rcf, 4 °C, 15 - 25 min). Anschließend wird die Probe in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die extrahierten Proteinlysate können für maximal eine Woche bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert werden.



### Abbildung 3.9: Versuchsdurchführung RNA-Extraktion

An DIV 7 erfolgt die Induktion der Exzitotoxizität mit 300 µM NMDA-Lösung für maximal 6 h. Dabei erfolgt vor Beginn der NMDA-Zugabe (0 h, Basal), nach 1 h, 2 h, 4 h und 6 h NMDA-Inkubation die Protein-Extraktion.

### 3.8.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Diese photometrische Methode zur Quantifizierung der Proteinmenge basiert auf der Wechselwirkung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine im saurem Milieu. Während das Absorptionsmaximum der braunroten, ungebundenen, kationischen Form des Farbstoffs bei 470 nm liegt, verschiebt sich dieses durch die Ausbildung des Farbstoff-Protein-Komplexes auf 595 nm. Der Farbstoff liegt dann in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Form als Sulfonat vor. Diese Absorptionsverschiebung kann photometrisch gemessen werden. Dazu wird die Probe, welche das Proteinlysate enthält, bei 595 nm gegen eine Kontrolle, welche ausschließlich das freie Farbreagenz ohne Protein enthält (*Blank*), vermessen. Die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Um von den gemessenen Absorptionswerten auf die Proteinkonzentration rückschließen zu können, ist die Kalibrierung des Photometers (siehe 2.1.1) notwendig. Für die Erstellung einer Kalibriergerade werden Standardproteine wie z. B. BSA verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgt in dafür vorgesehenen Plastik-Einwegküvetten (siehe 2.2.7). Es werden 97 µl dH<sub>2</sub>O vorgelegt und 3 µl Proteinlösung bzw. Lösemittel (Kontrolle) zugegeben. Nach Zusatz von 1 ml Bradford-Lösung (siehe 2.2.7) und 5 minütiger Inkubation im Dunkeln wird jede Probe drei Mal vermessen und anschließend der Mittelwert aus den Einzelkonzentrationen berechnet.

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

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel.

#### **Probenvorbereitung**

Durch Zugabe der entsprechenden Mengen an dH<sub>2</sub>O und Probenpuffer (4x Laemmli in Kombination mit Dithiothreitol (DTT), siehe 2.2.7) erfolgt die Konzentrationseinstellung der Proteinlysate auf 0,9 µg/ml. Anschließend werden die Proben für 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt um eine vollständige Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zu erzielen. Das im Probenpuffer im Überschuss enthaltene SDS dient einerseits der Denaturierung der Proteine und andererseits der Maskierung ihrer Eigenladung, da diese sonst die elektrische Mobilität der Proteine beeinflussen würde. So binden 1,4 g des anionischen Detergens SDS etwa 1 g Protein (1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren). Die SDS-Maskierung führt dazu, dass alle in der Probe enthaltenen Proteine eine konstante negative Ladung besitzen, welche proportional zu ihrer Masse ist. Darüber hinaus stoßen sich die negativ geladenen SDS-Proteine-Komplexe gegenseitig ab. Dies führt, in Kombination mit der während der Probenvorbereitung vorgenommenen Denaturierung der gefalteten Proteine, zu einer linearen Ausrichtung dieser. Dadurch wird die elektrophoretische Auftrennung der Proteine basierend auf ihrer Molekülmasse weiter unterstützt. Das zur Auftrennung der Proteine verwendete Gel ist eine Polyacrylamidmatrix, welche als molekulares Sieb fungiert. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode, wobei ihre Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülmasse ist. Kleinere Proteine werden aufgrund des geringeren Widerstands weniger stark zurückgehalten und durchwandern das Gel schneller als größere Proteine. Das dem 4x Laemmli Puffer zugesetzte DTT unterstützt ebenfalls die Denaturierung der Proteine, indem es für die Faltung der Proteine notwendige Disulfidbrücken reduziert. Darüber hinaus enthält der Puffer Glycerin, wodurch die Probendichte erhöht und das Absinken der Proben in die Geltaschen erleichtert wird. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau dient der Markierung der Lauffront der Proteine im Gel.

#### **Herstellung des Polyacrylamidgels**

Die SDS-PAGE nach Laemmli stellt eine diskontinuierliche Elektrophoreseform dar, d. h. die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Trenngel (siehe 2.2.7) mit einem davorliegenden Sammelgel (siehe 2.2.7) unterschiedlicher Porengröße. Die Diskontinuität bezieht sich dabei hauptsächlich auf die unterschiedlichen pH-Werte, der für die Herstellung der Gele verwendeten Puffer (Sammelgel: Neutraler pH, Trenngel: Basischer pH). Das Prinzip der

Polyacrylamidgelherstellung beruht auf der radikalischen Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Dabei dient das Bisacrylamid der Quervernetzung der linearen Polyacrylamidketten. Die Porengröße des Gels wird durch den Anteil an Gesamt-Acrylamiden sowie der Konzentration an quervernetzendem Bisacrylamid bestimmt und richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. So erfolgt die Auftrennung kleinerer Proteine mit hochprozentigeren, dichteren Gelen. Für die Auftrennung größerer Proteine hingegen werden Gele mit einem geringeren Acrylamidanteil und somit größeren Poren verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Auftrennung der Proteinlysate Trenngele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 10 % verwendet. Als Radikalstarter für die Polymerisation wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt, Tetramethylethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator. Die Gele werden in einen kleinen Spalt zwischen zwei Glasplatten, welche in eine spezielle Gelgieß-Apparatur eingespannt werden, gegossen. Mit einer 10 ml-Stripette wird zunächst das Trenngel in den Spalt zwischen den Platten pipettiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass Füllhöhe bei allen Gelen etwa gleich hoch ist (ca. 75 %). Anschließend wird das noch nicht ausgehärtete Trenngel mit 100 %-igem Isopropanol überschichtet. Dadurch wird eine glatte, blasenfreie Oberkante erzielt. Zugleich verhindert die Isopropanolschicht, dass die dem Gelpuffer zur Polymerisierung zugesetzten Radikale von Luftsauerstoffmolekülen abgefangen werden. Nach ca. 1 h ist das Gel vollständig auspolymerisiert und der Isopropanol wird entfernt. Anschließend wird die Sammelgel-Mischung auf das Trenngel gegossen und unter Vermeidung von Blasenbildung wird ein Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation (ca. 1 h) kann dieser vorsichtig entfernt werden und die entstandenen Taschen werden mit VE-Wasser aufgefüllt. Um ein vollständiges Auspolymerisieren zu gewährleisten, werden die Gele meist am Vortag gegossen und über Nacht bei 4 °C in feuchte Tücher eingewickelt gelagert. Für die nachfolgende Gelelektrophorese werden die Glasplatten mit den Gelen in das innere Modul der Elektrophoresekammer eingespannt und dieses in das äußere Modul eingesetzt. Anschließend wird das innere Modul der Kammer bis zur oberen Kante der Glasplatten mit Elektrophoresepuffer (1x Elphor-Puffer, siehe 2.2.7) befüllt. Die äußere Kammer hingegen wird nur soweit befüllt, dass der elektrodenverbindende Draht vollständig bedeckt ist. Nun erfolgt die Probenauftragung (je 20 µl) in die Geltaschen mittels 50 µl Hamilton-Spritze. Dabei wird in die beiden Taschen rechter- und linkerseits der Proben ein Proteinmarker (3 µl in 12 µl Wasser, siehe 2.2.7) aufgetragen. Alle leeren Taschen werden mit 20 µl 1x Laemmli befüllt um eine gleichmäßige Lauffront der Proteine zu erzielen. Zu Beginn der Elektrophorese wird eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Proben aus dem Sammelgel gelaufen sind kann die Spannung auf 120 V erhöht werden. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Größe der Proteine die aufgetrennt werden sollen. Der

Grad der Auftrennung kann anhand der Auftrennung des Proteinmarkers, der farbige markierte Proteine definierter Größe enthält, abgelesen werden.

### 3.8.4 Western Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können im Western Blot auf eine Trägermembran transferiert werden. Die dadurch konservierten Proteine können anschließend unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der Proteintransfer vom Gel auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgt in horizontaler Ausrichtung durch Anlegen eines elektrischen Felds. Dabei wandern die mit SDS komplexierten und somit negativ geladenen Proteine zur Anode. Beim sogenannten *Semi-Dry*-Verfahren wird die Trägermembran anodenseitig auf das Gel gelegt. Membran und Gel werden zwischen zwei Stapel aus Filterpapieren, welche zuvor mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer (siehe 2.2.7) durchfeuchtet wurden, platziert. Die Filterpapier-Stapel stehen in direktem Kontakt mit den ebenfalls zuvor befeuchteten Elektrodenplatten der WB-Apparatur. Der Begriff *Sem-Dry* bezieht sich dabei auf die Verwendung einer begrenzten Menge an Puffer, da diese auf die von den Filterpapieren aufgesaugte Menge beschränkt ist. Vor Beginn des WB müssen die Filterpapiere und die Membran zunächst auf die entsprechende Größe (abhängig von der Gelgröße) zugeschnitten werden. Um die Hydrophobie der PVDF-Membran zu verringern und eine bessere Benetzung mit Transferpuffer zu erzielen, wird diese kurz in Methanol eingelegt. Anschließend werden 5 Filterpapiere, sowie die Membran für 30 min in Anodenpuffer getränkt. Die andere Hälfte der Filterpapiere wird ebenfalls für 30 min in Kathodenpuffer eingelegt. Nach ausreichender Wässerung und anschließender Benetzung der platinbeschichteten Anodenplatte mit Anodenpuffer, erfolgt der sandwichartige Aufbau des Blots. Dazu wird der Stapel an in Anodenpuffer getränkten Filterpapieren mittig auf der Anodenplatte platziert. Anschließend wird die PVDF-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Nun wird das Sammelgel, unter fließendem Wasser mit Hilfe eines Plastikschabers vom Trenngel abgetrennt und ebenfalls luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt. Anschließend wird das Gel mit dem Stapel an in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren bedeckt. Zuletzt wird dann die Kathodenplatte, welche zuvor gut gewässert und mit Kathodenpuffer benetzt wurde, aufgelegt. Die ganze Apparatur wird mit einer gefüllten 2 l Glasflasche beschwert und an die Stromquelle angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgt für 110 min bei 60 mV. Werden in einer *Blotting*-Apparatur parallel 2 Western Blots durchgeführt, muss die Stromstärke auf 220 mV erhöht werden.



### 3.8.5 Proteindetektion

Um die Expression einzelner Proteine nachweisen zu können werden die Membrane in spezifischen Antikörperlösungen inkubiert. Davor müssen jedoch alle unspezifischen Bindungsstellen der Membran abgesättigt werden. Dazu werden die Membrane auf einem Schüttler für 1 h in 5 %-iger Milchpulverlösung (siehe 2.2.7) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (je 10 min) in 1x TBST-Puffer (siehe 2.2.7) wird die Membran mit einem Skalpell zugeschnitten. Dies ermöglicht die parallele Detektion verschieden großer Proteine. Beim Schneiden der Membran dienen die Banden des Proteinmarkers als Orientierung. Die einzelnen proteinbeladenen Membranstreifen werden in den jeweiligen Primärantikörperlösungen (siehe 2.2.7) in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon *Tubes*) über Nacht bei 4 °C auf einem Reagenzglasrotator inkubiert. Dabei binden die Primärantikörper an spezifische Epitope des gesuchten Proteins. Am Folgetag wird unspezifisch gebundener sowie nicht gebundener Antikörper durch 3-maliges Waschen (je 10 min) mit 1x TBST-Puffer entfernt. Anschließend werden die Membranstücke für 1 h in einer Sekundärantikörperlösung (siehe 2.2.7) bei RT auf dem Reagenzglasrotator inkubiert. Dabei bindet der Sekundärantikörper an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Um die spätere Detektion der Banden zu ermöglichen, ist der Sekundärantikörper zudem an ein Fluorophor (Cy3 oder Cy5) gekoppelt. Aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Licht erfolgt die Inkubation in mit Alufolie umwickelten 50 ml *Tubes*. Auch die nachfolgenden Waschschrte (5 x 5 min) erfolgen unter Lichtausschluss. Bevor die Proteine detektiert werden können, müssen die Membranabschnitte zwischen fusselfreien Tüchern vollständig getrocknet werden. Die Detektion der Proteine erfolgt mit dem Amersham Imager 600 (siehe 2.1.1). Für die Auswertung und Quantifizierung der Proteinbanden wird die Image Quant TL Software (siehe 2.1.2) genutzt. Dabei werden alle Banden einer Membran zunächst untereinander normalisiert und zur Quantifizierung auf die Expression eines Referenzproteins bezogen. Als Referenzprotein bzw. Standard dient  $\beta$ -Aktin, ein Protein, welches unabhängig vom Genotyp und der Behandlung exprimiert wird.

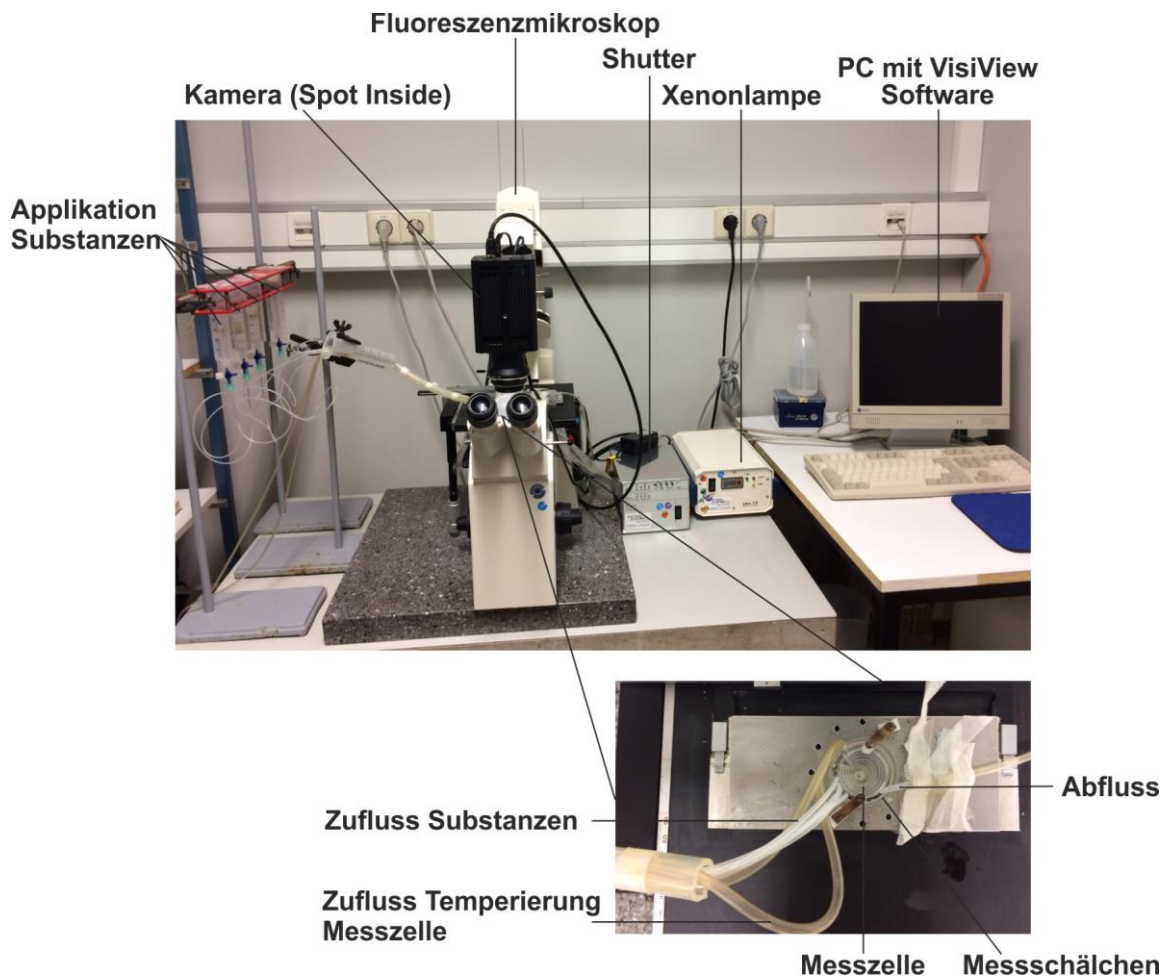
### 3.9 Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Detektion der Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration nach Stimulation mit NMDA-Lösung erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM, siehe 2.2.8). Dabei handelt sich um ein membrangängiges Derivat des Fura-2. Durch die Veresterung kann dieses durch passive Diffusion über die Membran in das Zellinnere gelangen. Dort wird der Acetoxymethylester durch intrazelluläre Esterasen abgespalten. Der Farbstoff liegt nun als hydrophiles und damit membranimpermeables Fluorophor vor und reichert sich im Cytosol an. Fura-2 wurde im Jahr 1985 zum ersten Mal von Grynkiewicz et al. synthetisiert (Grynkiewicz et al. 1985). Seine Struktur leitet sich von

den Calcium-Chelatoren EGTA (Ethylenglycol-Bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-Tetraessigsäure) und BAPTA (1,2-Bis(*o*-aminophenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-Tetraessigsäure) ab. Dadurch ist Fura-2 in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reversibel und konzentrationsabhängig zu binden. Dabei kommt es durch die Komplexbildung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in einem 1:1 Verhältnis zu einer Verschiebung der Anregungswellenlänge des Fura-2-Farbstoffes. Während ungebundenes Fura-2 bei 380 nm angeregt wird, besitzt mit  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenes Fura-2 eine maximale Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm. Demnach nimmt die Fluoreszenzintensität mit Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei 340 nm zu und bei 380 nm ab. Anhand der simultanen Detektion der Fluoreszenzintensität bei beiden Wellenlängen kann die relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge sowie die Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bestimmt werden. Dabei erfolgt die Berechnung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus dem Verhältnis der Emissionsraten nach Anregung bei 340 nm (Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex) und 380 nm (freies Fura-2) (FL Ratio 340/380).

### 3.9.1 Aufbau der Calcium-Messapparatur

Für alle Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  werden primäre cerebelläre Granularzellen entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 3.5 isoliert und kultiviert. Die Zellen werden auf spezielle Calciummessschälchen ausgebracht. Die Menge an ausgebrachten Zellen pro Schälchen beträgt  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 1 ml Medium (siehe Abschnitt 3.5.2, Tabelle 3.9). Der Aufbau der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messapparatur (siehe 2.1.1) ist für alle Experimente identisch. Diese besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert S100, siehe 2.1.1) mit einem 20x Objektiv, an das eine Kamera (Spot Inside, siehe 2.1.1) angeschlossen ist, welche über die Software VisiView (siehe 2.1.2) gesteuert werden kann. Zudem ist an das Mikroskop eine Xenonlampe (siehe 2.1.1) angeschlossen, welche wiederum an einen *Shutter* (siehe 2.1.1) gekoppelt ist, wodurch Licht mit 340 nm und 380 nm erzeugt werden kann. Die Messapparatur ist mit einer Vorrichtung verbunden, über die unterschiedliche Substanzen appliziert werden können. Dazu werden verschiedenen Lösungen in senkrecht fixierte 50 ml Spritzen gefüllt und anhand ihres hydrostatischen Drucks gleichmäßig über einen dünnen Schlauch in eine Messzelle geleitet, welche direkt in das Messschälchen eingesetzt wird. Eine Absaugvorrichtung sorgt für einen kontinuierlichen Abfluss der Lösungen. Im Anschluss an die Messung erfolgt die Auswertung der aufgenommenen Bildersequenz. Dazu werden die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen für beide Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) für jeden Messzeitpunkt mit der Software ImageJ (siehe 2.1.2) ermittelt. Anschließend wird das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten (FL Ratio 340/380) graphisch gegen die Dauer der Messung aufgetragen. Zudem können die *Area under the curve* (AUC) und die maximale relative  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $R_{\max}$ ) bestimmt werden.



**Abbildung 3.10: Aufbau der Calcium-Messapparatur**

Die Apparatur zur Bestimmung der  $[Ca^{2+}]_i$  besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop an das eine Kamera angeschlossen ist, welche über die VisiView Software gesteuert werden kann. Durch Kopplung der Xenonlampe mit einem *Shutter* kann Licht mit 340 nm/380 nm Wellenlänge erzeugt werden. Mittels senkrecht fixierten 50 ml Spritzen können verschiedene Superfusionslösungen appliziert werden. Diese Lösungen werden über dünne Schläuchchen in eine auf 37° C temperierte Messzelle geleitet. Ein an eine Absaugpumpe angeschlossener Abflussschlauch verhindert das Überlaufen des Messschälchens.

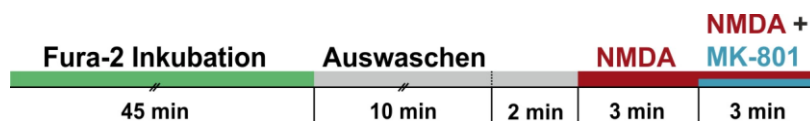
### 3.9.2 Durchführung der Calcium-Messungen

Im Verlauf der  $Ca^{2+}$ -Messungen werden verschiedene Versuchsparadigmen getestet. Zum einen wird die Änderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration während der Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an NMDA (100  $\mu$ M und 300  $\mu$ M, siehe 2.2.8) in Abwesenheit oder in Kombination mit 2  $\mu$ M MK-801-Lösung (siehe 2.2.8) gemessen. Zum anderen wird eine Messreihe durchgeführt, bei der die Zellen wiederholt einer 3-minütigen NMDA-Stimulation (300  $\mu$ M) ausgesetzt werden. Alle während der Versuche applizierten Lösungen werden auf 37 °C erwärmt. Vor Versuchsbeginn wird zunächst das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt und die Zellen werden mit 1 ml 37 °C warmer Locke-Lösung (siehe 2.2.8) gewaschen. Anschließend wird jedes Messschälchen mit 1 ml frischer Locke-Lösung befüllt und es werden 2,5  $\mu$ l 1 mM Fura-2-AM-Lösung zugegeben. Nach

Inkubation für 45 min im Brutschrank wird ein Tropfen Immersionsöl (siehe 2.2.8) auf das Objektiv gegeben und das Messschälchen samt Messzelle eingesetzt. Vor Beginn der eigentlichen Messung wird für 10 min mit Locke-Lösung gespült um überschüssiges Fura-2 zu entfernen. Die Durchführung der verschiedenen Versuche ist in Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 graphisch dargestellt.

### Stimulation mit 100 $\mu\text{M}$ /300 $\mu\text{M}$ NMDA $\pm$ 2 $\mu\text{M}$ MK-801

Die Versuchsdauer der ersten Messreihe beträgt insgesamt 8 min. Dabei erfolgt zu Beginn des Experiments zunächst die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Basalbedingungen (*Baseline*). Dazu wird die FL 340/380 Ratio für 2 min unter Zugabe von Locke-Lösung gemessen. Nachfolgend erfolgt die Stimulation mit entweder 100  $\mu\text{M}$  oder 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung für 3 min. Anschließend wird eine Mischung aus 100  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung und 2  $\mu\text{M}$  MK-801-Lösung für ebenfalls 3 min zugeführt. Als Messfrequenz wurde ein Intervall von 2 sec gewählt, d. h. alle 2 sec erfolgt die simultane Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei 340 nm und 380 nm Anregungswellenlänge. Es wird die FL Ratio 340/380 für jeden Messpunkt sowie der maximale Anstieg der relativen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $R_{\text{max}}$ ) und die AUC bestimmt.

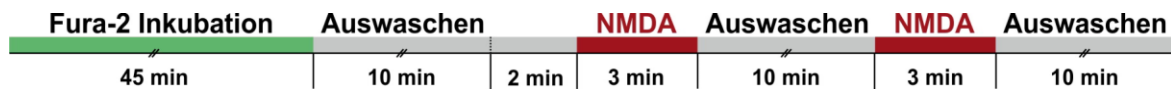


#### Abbildung 3.11: Versuchsdurchführung $\text{Ca}^{2+}$ -Messung während NMDA-Stimulation

Zeitlicher Ablauf der Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der NMDA-Stimulation ohne (rot) bzw. mit Co-Applikation von MK-801 (rot/blau). Dabei wird der Versuch sowohl mit 100  $\mu\text{M}$  als auch mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung durchgeführt.

### Repetitive Stimulation mit 300 $\mu\text{M}$ NMDA

Dieses Setup sieht die wiederholte Stimulation mit NMDA vor. Dazu wird wie beim vorherigen Experiment auch, zunächst das Basalniveau der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bestimmt. Dies erfolgt durch Zugabe von Locke-Lösung für 2 min. Anschließend werden die Zellen für 3 min mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung stimuliert. Dem schließt sich eine 10-minütige Auswaschphase mit Locke-Lösung an. Nun erfolgt die erneute NMDA-Stimulation für 3 min mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung. Nachfolgend wird nochmals für 10 min mit Locke-Lösung ausgewaschen. Es wird die FL Ratio 340/380 für jeden Messpunkt sowie der maximale Anstieg der relativen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $R_{\text{max}}$ ) und die AUC bestimmt.



**Abbildung 3.12: Versuchsdurchführung  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wiederholte NMDA-Stimulation**

Zeitlicher Ablauf der Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während wiederholter NMDA-Stimulation. Zwischen den beiden NMDA-Applikationsphasen (rot) sowie nach der zweiten NMDA-Zufuhr wird jeweils für 10 min mit Locke-Lösung ausgewaschen (grau.)

### 3.10 Statistik

Die erhobenen Ergebnisse werden in den Diagrammen als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorov-Smirnow-Test zunächst überprüft, ob die zugrunde liegende Grundgesamtheit einer Stichprobe normalverteilt vorliegt. Nachfolgend wurde für die statistische Analyse zweier Wertegruppen (Genotypen: WT *versus* Slack-KO; Setups: unstimuliert *versus* NMDA-Behandlung) ein zweiseitiger Student-t-Test (unter Annahme gleicher Varianzen) durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung der *in vivo* Exzitotoxizitätsversuche wurde zudem ein Levene-Test zur Überprüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei Wertegruppen untereinander erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (2-way ANOVA). Als Post-hoc Test wurde für die *in vitro* CGC-Experimente mit Glutmat eine Bonferroni-Korrektur angewendet. Die Messwerte der *in vitro* NMDA-Exzitationsstudie folgen keiner Normalverteilung, weshalb zur Berechnung der Signifikanzen ein Friedman-Test mit Dunn-Bonferroni Post-hoc Test angewandt wurde. Die Daten der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (1-way ANOVA) sowie 2-way ANOVA und Student-t-test mit verbundenen Werten analysiert. Für die RNA-Expressionsexperimente wurden signifikante Unterschiede anhand eines ANOVAs mit Messwiederholung und Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Lag keine Sphärizität (Mauchly-Test) vor wurde zudem eine Greenhouse-Geisser-Korrektur angewandt. Teilweise wurde auch ein Friedeman-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur verwendet. Für alle Testarten wurden P-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. Es wurde zwischen  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  und  $***p < 0,001$  differenziert. In den Abbildungen sind die Signifikanzlevel für den zweiseitigen Student-t-Test dargestellt. Nicht signifikante Unterschiede  $p > 0,05$  sind nicht gekennzeichnet.

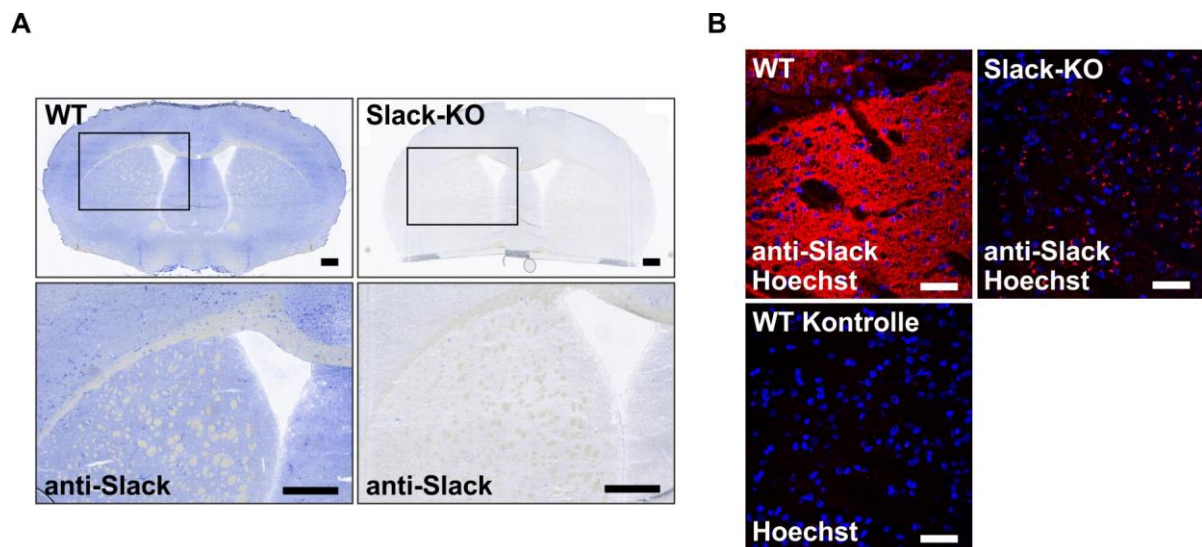
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einfluss von Slack auf die NMDA-induzierte exzitotoxische Schädigung *in vivo***

Zur Überprüfung der in Abschnitt 1.7 formulierten Hypothese, dass die Slack-Kanalaktivität während exzitotoxischer Prozesse ein neuroprotektiver Mechanismus darstellen könnte, wurden vergleichende *in vivo* Exzitotoxizitätsstudien an WT und Slack-KO Mäusen durchgeführt. Dazu erfolgte die intrastriatale Injektion geringer Volumina an NMDA-Lösung (siehe 2.2.5). Dabei handelt es sich um ein etabliertes Modell zur Untersuchung exzitotoxischer Schädigung *in vivo* (Ayata et al. 1997, Mandir et al. 2000). In diesem Zusammenhang wurde zunächst das striatale Expressionsmuster von Slack untersucht.

#### **4.1.1 Expressionsanalyse von Slack-Kanälen im Striatum**

Die Validierung der Expression von Slack im Striatum ist von essenzieller Bedeutung für die nachfolgenden *in vivo* Experimente zur NMDA-induzierten Exzitotoxizität. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, konnten durch immunhistochemische AP-Färbungen (siehe 3.3.2) sowie IF-Färbungen (siehe 3.3.3) koronarer WT- und Slack-KO-Gehirnschnitte, Slack-Kanäle im Striatum von WT Mäusen nachgewiesen werden. Dabei wurden diese v. a. in den Neuronen des Putamen detektiert, während die Faserbündel keine Slack-Immunreaktion zeigten und ungefärbt blieben. In den Gehirnschnitten von Slack-KO Mäusen konnte erwartungsgemäß keine spezifische Slack-Färbung festgestellt werden. Die Verifizierung der Slack-Expression im Striatum ermöglicht die nachfolgende experimentelle Untersuchung Slack-abhängiger Effekte in striatalem Gewebe.



**Abbildung 4.1: Expressionsanalyse von Slack im Striatum adulter WT und Slack-KO Mäuse**

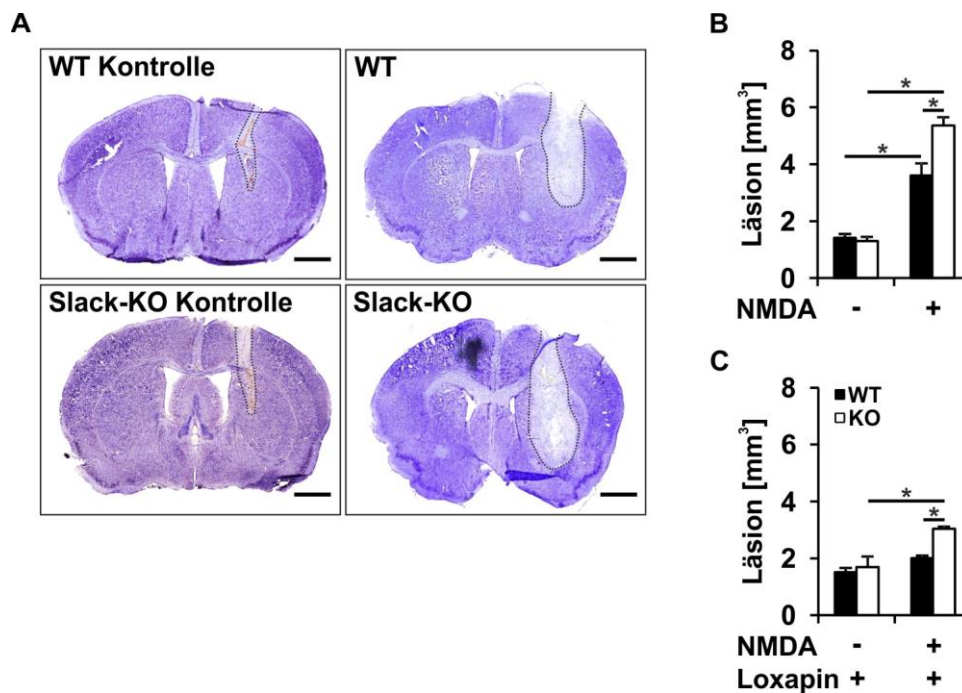
Immunhistochemische (IHC)- und Immunfluoreszenz (IF)-Färbung koronarer Gehirnschnitte von adulten WT- bzw. Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen. **A** IHC-Nachweis von Slack-Kanälen im Gesamtgehirn (oben) bzw. im Striatum (unten) mit anti-Slack Primärantikörper (Neuromab, 1:200) und Biotin-anti-Maus-IgG (1:800). **B** IF-Färbung mit anti-Slack Primärantikörper (Neuromab, 1:100) und Alexa 555-anti-Maus IgG1 Sekundärantikörper (1:800). Die Maßstabsbalken entsprechen in **A** 500 µm und in **B** 50 µm.

#### 4.1.2 Einfluss von Slack auf die Neuroprotektion im Rahmen NMDA-induzierter Exzitotoxizität *in vivo*

Um die Funktion des Slack-Kanals während der Exzitotoxizität *in vivo* zu untersuchen, wurden männliche WT und Slack-KO Wurfgeschwister im Alter von 10 bis 21 Tagen intrastriatalen NMDA- bzw. PBS-Mikroinjektionen (300 nl) (siehe 3.4.1) unterzogen. Dabei wurde zur OP-Kontrolle PBS injiziert. Dies ermöglicht die Abgrenzung des NMDA-induzierten Neuronenschadens von der Schädigung der Gehirnstruktur, bedingt durch die invasive Operation. Die Auswertung des Neuronenschadens erfolgte anhand von Nissl gefärbten Kryoschnitten. Die Quantifizierung des Läsionsareals wurde mit dem Computerprogramm Image J (siehe 2.1.2) durchgeführt. Dabei wurde nach Nissl-Färbung der Gehirnschnitte für jeden dritten Gehirnschnitt verblindet das Areal an geschädigter Hirnstruktur ausgemessen und anschließend das Läsionsvolumen berechnet (siehe 3.4.2).

Des Weiteren wurde die neuronale Schädigung nach Prästimulation der Slack-Kanäle mit dem Slack-Aktivator Loxapin untersucht. Dazu wurde den Mäusen vor Beginn der striatalen NMDA-Injektion Loxapin i.p. verabreicht. Hintergrund des Experiments waren bereits publizierte Befunde die eine Potenzierung der Slack-anhängigen Neuroprotektion nach Aktivierung der Kanäle mit Loxapin in DRG-Neuronen zeigen (Lu et al. 2015). Die Durchführung sowie Auswertung des Experiments erfolgte analog zur oben beschriebenen PBS-/NMDA-Injektion ohne Loxapin. Die Ergebnisse der *in vivo* Exzitotoxizitätsuntersuchung sind in Abbildung 4.2 dargestellt.





#### Abbildung 4.2: Einfluss von Slack auf die NMDA-induzierte Neuronenschädigung *in vivo*

**A** Repräsentative Nissl-Färbungen von Gehirnschnitten von WT- und Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen nach striataler Mikroinjektion von PBS (Kontrolle) bzw. NMDA (20 nmol). Das ungefärbte Areal in der rechten Hemisphäre entspricht der Läsion. **B** und **C** Quantifizierung des Läsionsvolumens von WT- und Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen nach **B** PBS- bzw. NMDA-Injektion und **C** Injektion von Loxapin i. p. vor Beginn der intrastriatalen PBS bzw. NMDA-Injektion. Maßstabsbalken in **A** entsprechen 1000  $\mu$ m. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; **B** PBS Kontrolle mit WT n=3, Slack-KO n=4 und NMDA mit WT n=7, Slack-KO n=10; **C** Loxapin Kontrolle mit WT n=4; Slack-KO n=4 und Loxapin + NMDA mit WT n=3; Slack-KO n=3; \* p < 0,01)

Sowohl in den WT- als auch Slack-KO Kontrolltieren zeigte sich 24 h nach Injektion von PBS ins Striatum nur eine kleine Läsion im Bereich der Einstichstelle der Injektionskanüle (siehe Abbildung 4.2 B; WT:  $1,42 \pm 0,14$  mm<sup>3</sup>, Slack-KO:  $1,31 \pm 0,14$  mm<sup>3</sup>). Erwartungsgemäß hatte die Deletion des Slack-Kanals keinen Einfluss auf die Läsionsgröße unter Kontrollbedingungen. Infolge der NMDA-Injektion ergaben sich sowohl für WT- als auch Slack KO Mäuse signifikant größere Läsionsareale als unter Kontrollbedingungen. Das Ausmaß der Schädigung wird einerseits durch den Einstich der Injektionskanüle und andererseits durch die NMDA-getriggerte Exzitotoxizität bestimmt. Slack-KO Mäuse zeigten infolge der Injektion von 20 nmol NMDA ins Striatum signifikant größere Gehirnläsionen als WT Tiere (siehe Abbildung 4.2 B; WT:  $3,66 \pm 0,049$  mm<sup>3</sup>, Slack-KO:  $5,34 \pm 0,32$  mm<sup>3</sup>; p=0,0133). Diese Befunde implizieren, dass Slack bei NMDA-induzierter Exzitotoxizität *in vivo* vor neuronalem Zelluntergang schützt.

Die in Abbildung 4.2 C dargestellten Ergebnisse zeigen die durchschnittliche Gehirnläsion von WT bzw. Slack-KO Tieren nach striataler PBS- bzw. NMDA-Injektion und Vorbehandlung der Mäuse mit Loxapin. Während die i. p. Loxapingabe keinen Einfluss auf das Läsionsvolumen unter Kontrollbedingungen (PBS) hat, zeigen die Tiere beider Genotypen nach Loxapininjektion und NMDA-Exzitotoxizität vergleichsweise kleiner Läsionen als zuvor.



Diese Befunde bestätigen einerseits die Validität der angewandten OP-Methode. So sind die PBS-Läsionen dieser zweiten Kohorte vergleichbar mit denen des ersten Versuchs ohne Loxapinvorbehandlung. Auch wurden erneut keine genotypabhängigen Unterschiede im basalen Läsionsvolumen festgestellt (WT:  $1,51 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ , Slack-KO:  $1,69 \pm 0,37 \text{ mm}^3$ ). Dies lässt auf eine reproduzierbare Durchführung der striatalen Injektion schließen. Des Weiteren scheint der positive Effekt von Loxapin auf das NMDA-induzierte Läsionsareal nicht ausschließlich auf der Aktivierung von Slack-Kanälen zu beruhen, da dieser unabhängig vom Genotyp der Tiere beobachtet werden kann. Auch nach Loxapinvorbehandlung bleiben die Slack-medierte Unterschiede in der Größe der NMDA-induzierten Läsion zwischen den Genotypen bestehen (WT:  $2,00 \pm 0,10 \text{ mm}^3$ , Slack-KO:  $3,03 \pm 0,08 \text{ mm}^3$ ;  $p=0,0027$ ).

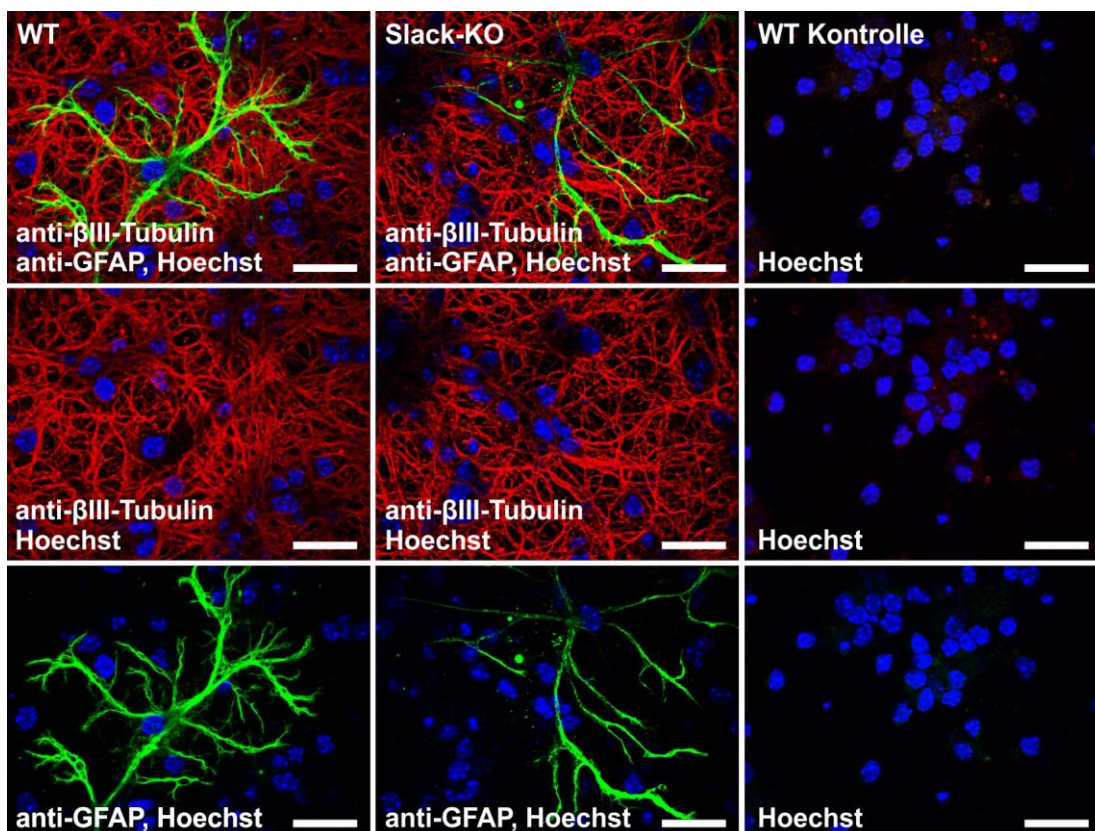
## **4.2 Etablierung und Charakterisierung der primären cerebellären Granularzellkultur**

Zur Aufklärung der Mechanismen über die die Slack-abhängige Neuroprotektion vermittelt wird, wurden analog zu den *in vivo* Exzitotoxizitätsuntersuchungen auch *in vitro* Exzitotoxizitätsversuche durchgeführt. Diese ermöglichten die gezielte Untersuchung des Einflusses von Slack auf die exzitotoxische Schädigung von Neuronen unabhängig von immunmodulatorischen Faktoren bzw. den Einflüssen anderer neuroprotektiver Systeme auf das Zellüberleben. Hierfür musste zunächst ein geeignetes Zellkultursystem etabliert werden. Erfahrungsgemäß (Contestabile 2002) eignen sich primäre cerebelläre Granularzellkulturen (CGC-Kulturen) besonders für exzitotoxische Untersuchungen (siehe 1.6.1).

### **4.2.1 Nachweis des Anteils neuronaler Zellen in der primären CGC-Kultur**

Bekannterweise ist der Anteil nicht-neuronaler Zellen in den primären CGC-Kulturen für die Ergebnisse der nachfolgenden Exzitotoxizitätsversuche von großer Bedeutung. Gliazellen, wie z. B. Astrozyten oder Mikroglia, nehmen sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen einen elementaren Einfluss auf verschiedene Prozesse innerhalb des ZNS. So konnte im Rahmen verschiedener Studien gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen durch den direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die neuronale Freisetzung löslicher Faktoren Einfluss auf die Morphologie der Gliazellen (Matsutani und Yamamoto 1997) hat. Zudem bestimmen diese Kontakte die gliale und neuronale Expression spezifischer Glutamattransporter (Gegelashvili et al. 1997), die neuronale Sensitivität gegenüber Glutamat-induzierter Exzitotoxizität (Brown 1999), die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Gliazellen (Pennypacker et al. 1996) und Neuronen (Kaltschmidt und Kaltschmidt 2000) sowie die neuronale Viabilität (Zhang und Fedoroff 1996). Gliazellen nehmen beispielsweise in Abhängigkeit von der Intensität des

exzitotoxischen Stimulus Einfluss auf die Reaktion von Neuronen auf diese exzitotoxische Stimulation. Dabei sind unterschiedliche Eigenschaften ruhender und aktivierter bzw. reaktiver Gliazellen von Bedeutung. Ruhende Gliazellen können durch die Sezernierung neurotropher Faktoren das Zellüberleben nach Zugabe niedriger Glutamatkonzentrationen positiv beeinflussen. Infolge der Stimulation mit hohen Konzentrationen an Glutamat hingegen kommt es zur Aktivierung der Gliazellen. Die nun reaktiven Gliazellen können zu einer gesteigerten Neurotoxizität beitragen (Perez-Capote et al. 2004). Um einen genotypabhängigen Einfluss der Gliazellen auf die nachfolgenden Exzitotoxizitätsuntersuchungen auszuschließen, wurde mittels IF-Färbungen der Anteil nicht-neuronaler Zellen in den kultivierten primären CGC-Kulturen an DIV 7 bestimmt. Zur Differenzierung zwischen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen wurden diese mit verschiedenen Primärantikörpern markiert. Hierfür wurde der Neuronenmarker anti- $\beta$ III-Tubulin sowie ein Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (anti-GFAP) (Materialien siehe 2.2.2), welches überwiegend von Astrozyten exprimiert wird, verwendet.



**Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzfärbung primärer cerebellärer Granularzellkulturen**

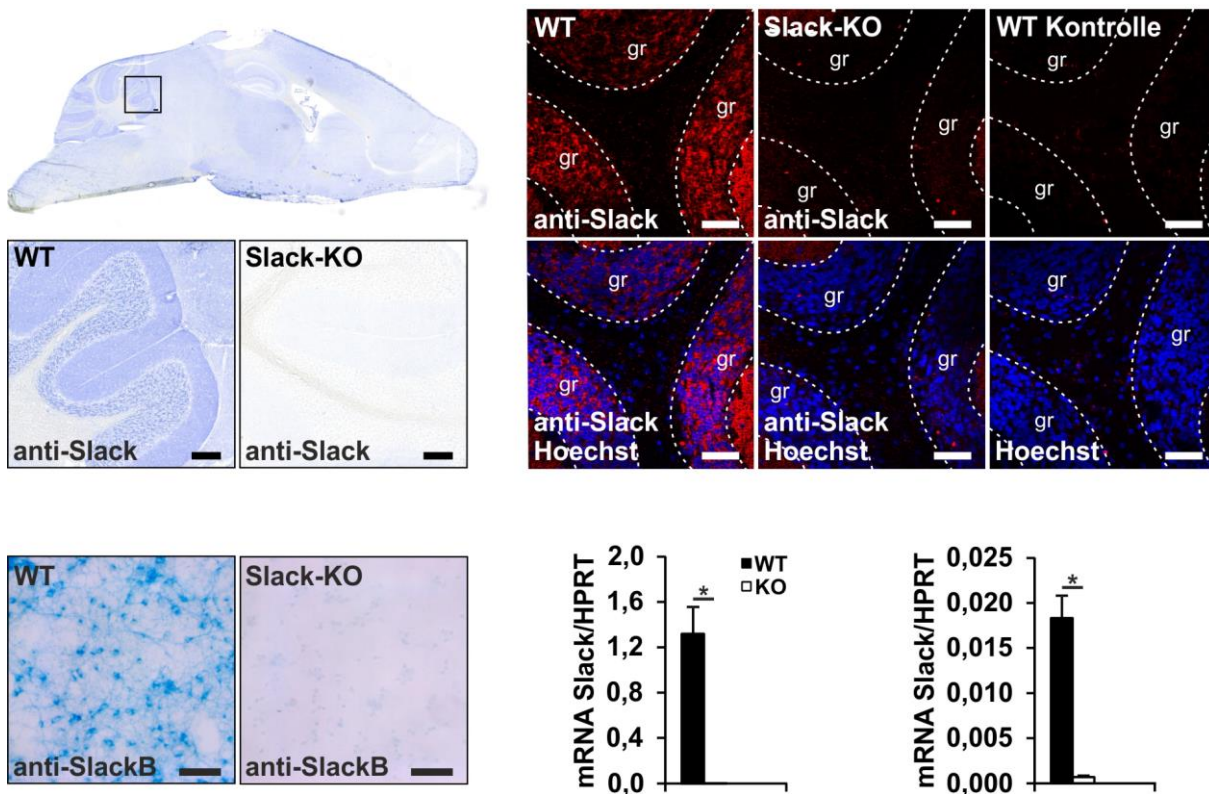
Bestimmung des Anteils neuronaler und nicht-neuronaler Zellen in CGC-Kulturen von WT-Mäusen (linke Spalte) bzw. Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen (mittlere Spalte) an DIV 7. Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Neuronenmarker anti- $\beta$ III-Tubulin (1:200, rot) und dem Astrozytenmarker anti-GFAP (1:500, grün). Die mit Hoechst gegengefärbten Kerne erscheinen blau. Standardmäßig wurden bei jeder Färbung eine Kontrolle (rechte Spalte) mitgeführt, bei der die CGC-Kulturen mit Sekundärantikörper ohne vorherige Inkubation mit Primärantikörper inkubiert wurden. Diese zeigt nach Zugabe der beiden Sekundärantikörper keine Färbung. Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu$ m.

Abbildung 4.3 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der IF-Färbung. Der anti- $\beta$ III-Tubulin Antikörper interagiert und markiert v. a. die Dendriten und Axone der Neurone, welche infolge der anti-Maus-Cy3 Sekundärantikörperinkubation optisch dargestellt werden konnten. Es ist ein gut ausgebildetes, dichtes, neuronales Netzwerk zu erkennen in dem nur vereinzelte Gliazellen erkennbar sind. Die mittels anti-GFAP und anti-Kaninchen-Alexa 488 visualisierten Astrozyten zeigen eine sternförmige Morphologie mit zahlreichen dünnen und wenig verzweigten Zellfortsätzen.

Die Quantifizierung des Anteils an Neuronen und Gliazellen erfolgte durch die Auszählung repräsentativer, gefärbter Ausschnitte von je drei WT und Slack-KO CGC-Kulturen (DIV 4). Dabei wurden pro Kultur zwischen 400 und 600 Zellen ausgezählt. Wie in der Masterarbeit von Frau K. Wild dargestellt beträgt der Anteil an Neuronen in WT und Slack-KO CGC-Kulturen  $\sim 90\%$  und der nicht-neuronaler Zellen  $\sim 10\%$ . Es wurden keine genotypabhängigen Unterschiede in der Zusammensetzung der CGC-Kulturen festgestellt (Wild 2016).

#### **4.2.2 Expressionsanalyse von Slack im Cerebellum und CGC-Kulturen**

Neben der Bestimmung der Zellpopulation der CGC-Kulturen war der Nachweis der Slack-Expression im Cerebellum bzw. in den cerebellären Granularzellen von großem Interesse für den weiteren Fortgang der vorliegenden Arbeit. Dieser erfolgte durch IHC-/IF-Färbung sagittaler Kryoschnitte adulter WT und Slack-KO Mäuse (Versuchsdurchführung siehe 3.3.2 und 3.3.3) bzw. durch die IHC-Färbung von CGC-Kulturen (Versuchsdurchführung siehe 3.3.5) beider Genotypen. Zudem wurden die Slack-mRNA-Expressionslevel aus RNA-Proben des Cerebellums bzw. von primären CGC-Kulturen mittels quantitativer RT-PCR Analyse (Versuchsdurchführung siehe 3.7) bestimmt. Als Bezugsgen wurden die die Expressionslevel von HPRT bestimmt. Die Ergebnisse dieser Expressionsnachweise sind in Abbildung 4.4 dargestellt.



**Abbildung 4.4: Expressionsanalyse von Slack im Cerebellum und CGC-Kulturen**

Nachweis der Slack-Expression in sagittalen Gehirnschnitten adulter WT- bzw. Slack<sup>-/-</sup>-Mäuse, sowie in Kulturen primärer cerebellärer Granularzellen (CGC-Kulturen). Bestimmung der relativen Slack-mRNA-Level mittels quantitativer RT-PCR. **A** IHC-Färbung bzw. **B** IF-Färbung von cerebellären Kryoschnitten mit anti-Slack Primärantikörper (Neuromab, 1:100) und Biotin-anti-Maus-IgG (1:800) bzw. Alexa 555-anti-Maus (1:800) Sekundärantikörper. Kernfärbung in **B** mit Hoechst. **C** IHC-Färbung von CGC-Kulturen an DIV 7. **D und E** Relative Slack-mRNA-Expressionslevel bezogen auf HPRT im **D** Cerebellum bzw. in **E** CGC-Kulturen. Die Maßstabsbalken entsprechen in **A** 200 µm und in **B und C** 50 µm; gr = Granularzellschicht. (Es sind Mittelwerte ± SEM gezeigt; \* p < 0,005)

Sowohl die IHC- als auch IF-Färbungen der Gehirnschnitte zeigen eine Expression der Slack-Kanalproteine v. a. in der Granularzellschicht, aber auch in der Molekularschicht des Cerebellums. Die Granularzellschicht enthält die Somata der Granularzellen, während die cerebelläre Molekularschicht die Axone der Granularzellen und die Dendriten der Purkinjenezell enthält. In der ungefärbten Purkinjenzellschicht sind die Somata der Purkinjenzellen lokalisiert. Die Ergebnisse der Färbungen deuten darauf hin, dass Slack-Kanäle im Cerebellum in den Granularzellen, jedoch nicht in den Purkinjenzellen exprimiert werden. Die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers (anti-Slack, Neuromab, Versuchsdurchführung siehe 3.3.2 und 3.3.3) wurde durch die Kontrollfärbung von Gehirnschnitten von Slack-KO Mäusen verifiziert. Diese zeigen erwartungsgemäß keine Slack-Immunreaktivität. Zudem wurden für beide Genotypen Färbekontrollen mitgeführt, bei denen die Gehirnschnitte statt mit Primärantikörper nur mit Blockierungslösung inkubiert wurden. Diese Kontrollen zeigen ebenfalls keine spezifische Färbung, wodurch die Bindung des Sekundärantikörpers an unspezifische Epitope ausgeschlossen werden kann. In

Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Färbung der Gehirnschnitte, war in den primären WT CGC-Kulturen ebenfalls eine spezifische Immunfärbung mit anti-Slack-B Primärantikörper (Bhattacharjee et al. 2002) zu beobachten. Interessanterweise wird Slack v. a. im Soma der cerebellären Granularzellneurone exprimiert. Die Färbungen der primären Slack-KO CGC-Kulturen weisen erwartungsgemäß keine spezifische Färbung auf.

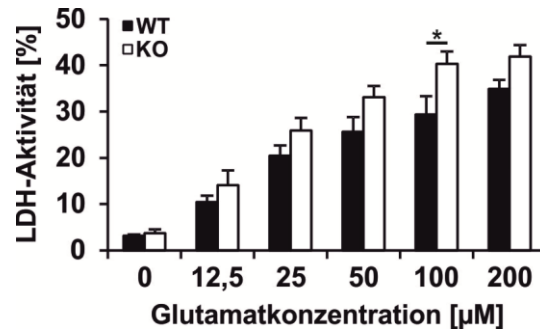
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IHC-/IF-Färbungen wurden im Cerebellum adulter WT Mäuse relativ hohe Slack-mRNA-Expressionslevel bezogen auf HPRT (WT:  $1,32 \pm 0,24$ ) detektiert. Auch in den an DIV 7 isolierten WT RNA-Proben aus CGC-Kulturen wurden Slack-Transkripte nachgewiesen. Dabei muss angemerkt werden, dass sich die in den WT CGC-Kulturen nachgewiesenen Slack-mRNA-Expressionslevel deutlich geringer als in den Cerebellumproben darstellten. Weder in den RNA-Lysaten der Slack-KO Cerebelli noch in denen der Slack-KO CGC-Kulturen konnte Slack-mRNA detektiert werden.

### **4.3 Untersuchungen zum Einfluss des Slack-Kanals auf die Exzitotoxizität *in vitro***

#### **4.3.1 Auswirkung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität auf das Zellüberleben**

Analog zu den in Abschnitt 4.1.2 dargestellten Ergebnissen sollte zunächst untersucht werden, ob sich die Deletion des Slack-Kanals negativ auf das neuronale Überleben während exzitotoxischer Stimulation von *in vitro* Kulturen auswirkt. In einem ersten Versuch wurde der Einfluss von Slack auf das neuronale Überleben primärer cerebellärer Granularzellen mittels vergleichender Analyse der Glutamat-induzierten Schädigung von WT und Slack-KO CGC-Kulturen untersucht. Dazu wurden die CGC-Kulturen an DIV 7 für 24 h mit unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (12,5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit fand die Quantifizierung des Zelltodes mittels LDH-Bestimmung statt (Materialien und Versuchsdurchführung siehe 2.2.5 und 3.6.2). Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 4.5 dargestellt.





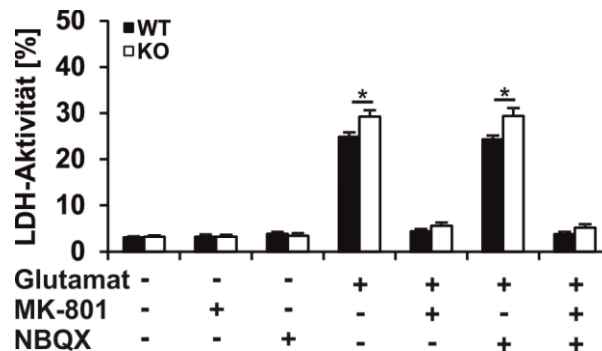
**Abbildung 4.5: Relative LDH-Freisetzung nach Inkubation mit Glutamat**

Quantifizierung der relativen LDH-Aktivität infolge 24 h Glutamat-induzierter Exzitotoxizität. Die basale LDH-Aktivität in den WT und Slack-KO CGC-Kulturen war identisch. Für beide Genotypen konnten für alle Glutamatkonzentrationen signifikante Unterschiede in der relativen LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Signifikanzen nicht gezeigt). Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die relative LDH-Aktivität und somit das Ausmaß an Zelltod mit zunehmenden Glutamatkonzentrationen zu. Slack-KO CGCs zeigen im Vergleich zu WT CGCs für alle untersuchten Glutamatkonzentrationen eine Tendenz höherer LDH-Aktivitäten. Bei der Inkubation mit 100 µM Glutamat zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Zellüberleben zwischen den Genotypen. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=6; \*  $p < 0,05$ ).

Unter basalen Bedingungen (Erhaltungsmedium) sind keine genotypabhängigen Unterschiede in der relativen LDH-Aktivität (WT:  $3,18 \pm 0,26$ , Slack-KO:  $3,71 \pm 0,87$ ,  $p = 0,64$ ) erkennbar. Dies ermöglicht den nachfolgenden Vergleich beider Genotypen in Bezug auf Slack-abhängige Unterschiede im Rahmen exzitotoxischer Schädigung. Sowohl in den Slack-KO als auch in den WT CGC-Kulturen kommt es infolge der Inkubation mit Glutamat zur signifikanten Zunahme der freigesetzten Menge an LDH. Dabei kann eine Korrelation zwischen der applizierten Glutamatkonzentration und dem Ausmaß an relativer LDH-Aktivität festgestellt werden. So kommt es mit ansteigenden Glutamatkonzentrationen zu einem stetigen Anstieg der LDH-Konzentration und somit des neuronalen Zelltods. Für alle untersuchten Glutamatkonzentrationen im Bereich zwischen 12,5 µM und 200 µM kann für die Slack-KO CGC-Kulturen eine tendenziell höhere LDH-Freisetzung verzeichnet werden als für die WT CGC-Kulturen. Diese Tendenz unterschiedlicher neuronaler Schädigung von Slack-KO und WT CGC-Kulturen manifestiert sich in einem signifikanten Unterschied bei der Inkubation mit 100 µM Glutamat (WT:  $29,35 \pm 3,97$ , Slack-KO:  $40,27 \pm 2,72$ ,  $p < 0,05$ ). Diese Ergebnisse deuten auf eine neuroprotektive Rolle des Slack-Kanals im Rahmen exzitotoxischer *in vitro* Untersuchungen hin. Die Daten wurden mit Unterstützung von Nadine Frank im Rahmen ihrer Masterarbeit generiert (Frank 2016).

### 4.3.2 Beteiligung verschiedener iGluRs an der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität

Um herauszufinden, welchen Anteil die beiden ionotropen Glutamatrezeptoren AMPA und NMDA an der Glutamat-induzierten neuronalen Schädigung in den CGCs haben, wurde das Ausmaß der Exzitotoxizität in Abhängigkeit der NMDA- bzw. AMPA-Rezeptorblockade untersucht (Materialien und Versuchsdurchführung siehe 2.2.5 und 3.6.1). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4.6 dargestellt.



**Abbildung 4.6: Einfluss der iGluRs AMPA/NMDA auf die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität**

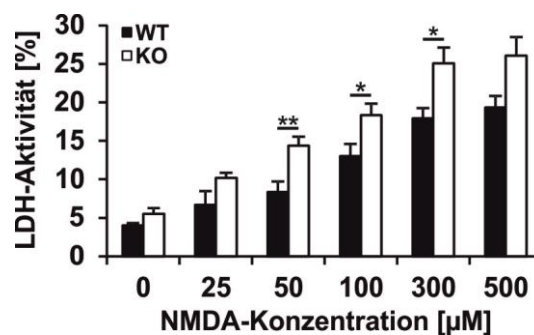
Quantifizierung der relativen Menge der freigesetzten LDH nach Zugabe von MK-801, NBQX, Glutamat sowie Kombinationen aus Glutamat und MK-801 oder/und NBQX. Keine Unterschiede in den relativen LDH-Aktivitäten von WT und Slack-KO CGC-Kulturen unter Basalbedingungen sowie nach Inkubation mit MK-801 und NBQX. Die Applikation der NMDA-/AMPA-Rezeptorblocker MK-801/NBQX hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben. Co-Applikation von MK-801 und Glutamat resultiert in der Unterdrückung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität und führt in beiden Genotypen zu vergleichbaren LDH-Aktivitätsleveln wie unter Kontrollbedingungen. Co-Applikation von NBQX zusätzlich zu Glutamat hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=7 und Slack-KO n=6; \* p < 0,05).

In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Ergebnissen werden unter Basalbedingungen (Erhaltungsmedium) keine genotypspezifischen Unterschiede in der relativen LDH-Aktivität (WT:  $3,07 \pm 0,27$ , Slack-KO:  $3,25 \pm 0,28$ , p = 0,67) und somit der Vitalität der CGC-Kulturen verzeichnet. Jedoch können nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Glutamat (in Übereinstimmung mit dem Experiment in Abbildung 4.5) aus den Überständen von Slack-KO im Vergleich zu WT CGC-Kulturen signifikant größere Konzentrationen an freigesetzter LDH detektiert werden (WT:  $24,90 \pm 0,97$ , Slack-KO:  $29,21 \pm 1,43$ , p < 0,05). Die Applikation des NMDA-Rezeptorblockers MK-801 sowie des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX hat in Abwesenheit von Glutamat keinen Einfluss auf die Vitalität der Neurone. Im Vergleich zur Glutamat-induzierten LDH-Aktivität führte eine Co-Applikation des NMDA-Antagonisten MK-801 (10  $\mu$ M) in Gegenwart von 100  $\mu$ M Glutamat zu einer signifikante Reduktion (WT und Slack-KO p < 0,001) der Messwerte (WT:  $4,41 \pm 0,47$ , Slack-KO:  $5,58 \pm 0,69$ , p = 0,22). NBQX hatte dagegen keinen Einfluss auf das Zellüberleben von WT und Slack-KO CGC-Kulturen. Entsprechend ergab die Quantifizierung der LDH-Aktivität nach Co-

Applikation von NBQX (10  $\mu\text{M}$ ) und 100  $\mu\text{M}$  Glutamat (WT:  $24,28 \pm 0,84$ , Slack-KO:  $29,38 \pm 1,74$ ) im Vergleich zur Glutamatstimulation der Zellen keine Unterschiede. Auch kann durch die gleichzeitige Blockade von NMDA- und AMPA-Rezeptoren (WT:  $3,81 \pm 0,47$ ; Slack-KO:  $5,16 \pm 0,76$ ) keine nennenswerte Steigerung der Reduktion der relativen LDH-Aktivität im Vergleich zur alleinigen NMDA-Rezeptorblockade erzielt werden. Diese in Abbildung 4.6 dargestellten Daten verifizieren die in Versuch 4.3.1 aufgezeigten genotypabhängigen Unterschiede im Zellüberleben bei Glutamat-vermittelter Exzitotoxizität. Zudem liefern sie Evidenz dafür, dass die Glutamat-induzierte Neuronenschädigung in WT und Slack-KO CGCs v. a. durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermittelt wird.

### 4.3.3 Auswirkung der NMDA-Rezeptorstimulation auf das Zellüberleben

Aufgrund der in Abschnitt 4.3.2 dargestellten Ergebnisse wurde im Folgenden, der Einfluss der Slack-Kanäle auf die Zellvitalität im Verlauf der gezielten Aktivierung von NMDA-Rezeptoren untersucht. Dazu wurden WT und Slack-KO CGC-Kulturen an DIV 7 für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an NMDA (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurde aus dem Zellüberstand mittels LDH-Assay die freigesetzte Menge an LDH bestimmt (Materialien und Versuchsdurchführung siehe 2.2.5 und 3.6.1). Die Ergebnisse der Quantifizierung der relativen LDH-Aktivität sind in Abbildung 4.7 zusammengefasst.



**Abbildung 4.7: Relative LDH-Freisetzung nach Inkubation mit NMDA**

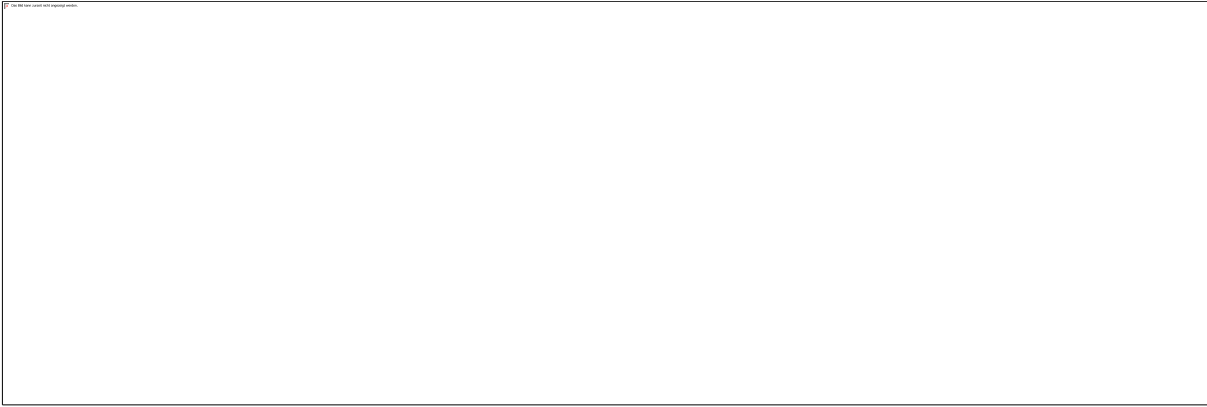
Quantifizierung der relativen LDH-Aktivität infolge 24 h NMDA-induzierter Exzitotoxizität. Keine Unterschiede in den relativen LDH-Aktivitäten von WT und Slack-KO CGC-Kulturen unter Basalbedingungen. In CGC-Kulturen beider Genotypen konnten für NMDA-Konzentrationen im Bereich zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  signifikant höhere relative LDH-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Signifikanzen nicht gezeigt). Im Vergleich zur Kontrolle nimmt die relative LDH-Aktivität und somit das Ausmaß an Zelltod mit zunehmender NMDA-Konzentration zu. Slack-KO CGCs zeigen im Vergleich zu WT CGCs für alle untersuchten NMDA-Konzentrationen eine Tendenz zur höheren LDH-Aktivität. Bei der Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  NMDA zeigen sich signifikante Unterschiede im Zellüberleben zwischen den Genotypen. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=7 und Slack-KO n=7; \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$ ).

Wie bereits in den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben, bestehen unter Basalbedingungen (Erhaltungsmedium) keine Unterschiede in der Vitalität der kultivierten WT und Slack-KO Granularzellen (WT:  $4,04 \pm 0,27$ , Slack-KO:  $5,53 \pm 0,75$ ). Nach Zugabe



unterschiedlicher NMDA-Konzentrationen und der dadurch induzierten exzitotoxischen Schädigung der CGCs kommt es zum Anstieg der relativen LDH-Aktivität. Dabei zeigen Slack-KO CGC-Kulturen für alle untersuchten Konzentrationen eine größere Sensitivität gegenüber NMDA als WT CGC-Kulturen. Dieser Unterschied ist bei 50  $\mu\text{M}$  NMDA (WT:  $8,33 \pm 1,38$ , Slack-KO:  $14,40 \pm 1,15$ ,  $p < 0,01$ ), 100  $\mu\text{M}$  NMDA (WT:  $13,00 \pm 1,61$ , Slack-KO:  $18,32 \pm 1,53$ ,  $p < 0,05$ ), sowie 300  $\mu\text{M}$  NMDA (WT:  $17,94 \pm 1,33$ , Slack-KO:  $25,09 \pm 2,03$ ,  $p < 0,05$ ) signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Slack-Kanäle einen neuroprotektiven Beitrag im Rahmen der NMDA-Rezeptor abhängigen Exzitotoxizität liefern.

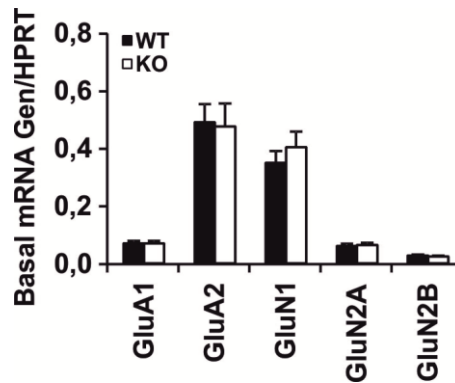
Abbildung 4.8 zeigt die Degradierung des Netzwerks cerebellärer Granularzellen in Abhängigkeit von der NMDA-Inkubationsdauer. Zur Darstellung der Neuronenschädigung infolge der NMDA-induzierten Exzitotoxizität wurden die CGC-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer IF-Färbung mit dem neuronenspezifischen Antikörper anti- $\beta$ III-Tubulin (rot) unterzogen (Material und Versuchsdurchführung siehe 2.2.2 und 3.3.6). Sowohl WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen wurden nach Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA für 1 h, 2 h, 6 h, 8 h und 24 h fixiert und nachfolgend gefärbt. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst gegengefärbt (blau). Basal (Kontrolle) ist kein genotypabhängiger Unterschied in der Dichte und der Vernetzung der Neurone sowie in der Anzahl an Zellkernen ersichtlich. Die Kulturen beider Genotypen weisen ein intaktes neuronales Netzwerk auf. Mit fortschreitender Dauer der NMDA-Inkubation ist eine zunehmende Auflösung der netzartigen Verbindungen zwischen den Zellen erkennbar. Es kommt zur Fragmentierung der Dendriten und Axone. Außerdem kann im Verlauf der Exzitotoxizität eine zunehmende Kondensation der Zellkerne festgestellt werden. Am deutlichsten zeigt sich der Verlust der neuronalen Struktur nach 24 h. Es sind nur noch kleine Bruchstücke des Neuronennetzwerks vorhanden. Anhand der Färbungen ist die Beurteilung möglicher Unterschiede zwischen WT und Slack-KO CGC-Kulturen jedoch nicht möglich.

**Abbildung 4.8: Zeitverlauf der NMDA-Rezeptor-abhängigen Exzitotoxizität in CGC-Kulturen**

Repräsentative IF-Färbungen des zeitlichen Verlaufs der NMDA-Exzitotoxizität in WT und Slack-KO CGC-Kulturen. Inkubation der Kulturen beider Genotypen mit 300  $\mu$ M NMDA für 1 h bis 24 h. IF-Färbung der Neurone mit anti- $\beta$ III-Tubulin Primärantikörper (rot, 1:200) und anti-Maus-Cy3 Sekundärantikörper nach 0 h (Basal), 1 h, 2 h, 6 h, 8 h und 24 h NMDA. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gegengefärbt (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu$ m.

**4.3.4 Zusammensetzung der ionotropen Glutamaterezeptoren in CGC-Kulturen**

Funktionelle ionotrope Glutamaterezeptoren bestehen aus vier gleichen oder unterschiedlichen Untereinheiten. Die Zusammensetzung der Tetramere ist dabei maßgeblich für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Rezeptoren, wie beispielsweise die Aktivierbarkeit, die Leitfähigkeit sowie die Permeabilität von  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, verantwortlich (Dingledine et al. 1999, Madry et al. 2007, Traynelis et al. 2010). Hierbei ist zu beachten, dass AMPA-Rezeptoren, welche die GluA2-Untereinheit exprimieren, nur wenig bis gar nicht permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind (Wright und Vissel 2012). Zudem ist bekannt, dass die NMDA-Rezeptoruntereinheit GluN2B vor allem im embryonalen Gehirn exprimiert wird, während GluN2A-Transkripte vor der Geburt nicht nachgewiesen werden können. Postnatal kommt es dann zu einer Abnahme der Expression der GluN2B-Untereinheit und im Gegenzug zur Zunahme der Expression der GluN2A-Untereinheit (Monyer et al. 1994) (siehe 1.3.1). Um zu überprüfen, ob die genotypabhängigen Unterschiede der NMDA-induzierten exzitotoxischen Schädigung auf einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Glutamaterezeptoren beruhen, war es von großem Interesse, die Expressionslevel der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten in den WT und Slack-KO CGC-Kulturen zu bestimmen. Mittels qRT-PCR Expressionsanalyse wurden die mRNA-Level der AMPA-Rezeptoruntereinheiten (GluA1 und GluA2) sowie der NMDA-Rezeptoruntereinheiten (GluN1, GluN2A und GluN2B) untersucht (Materialien und Versuchsdurchführung siehe 2.2.7 und 3.7). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Abbildung 4.9 dargestellt.



**Abbildung 4.9: Expressionslevel der AMPA-/NMDA-Rezeptoruntereinheiten**

Basal sind keine genotypspezifischen Unterschiede in der mRNA-Expression der verschiedenen AMPA-/NMDA-Rezeptoruntereinheiten feststellbar. Untersuchte AMPA-Rezeptoruntereinheiten: GluA1 und GluA2, NMDA-Rezeptoruntereinheiten: GluN1, GluN2A und GluN2B. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=5).

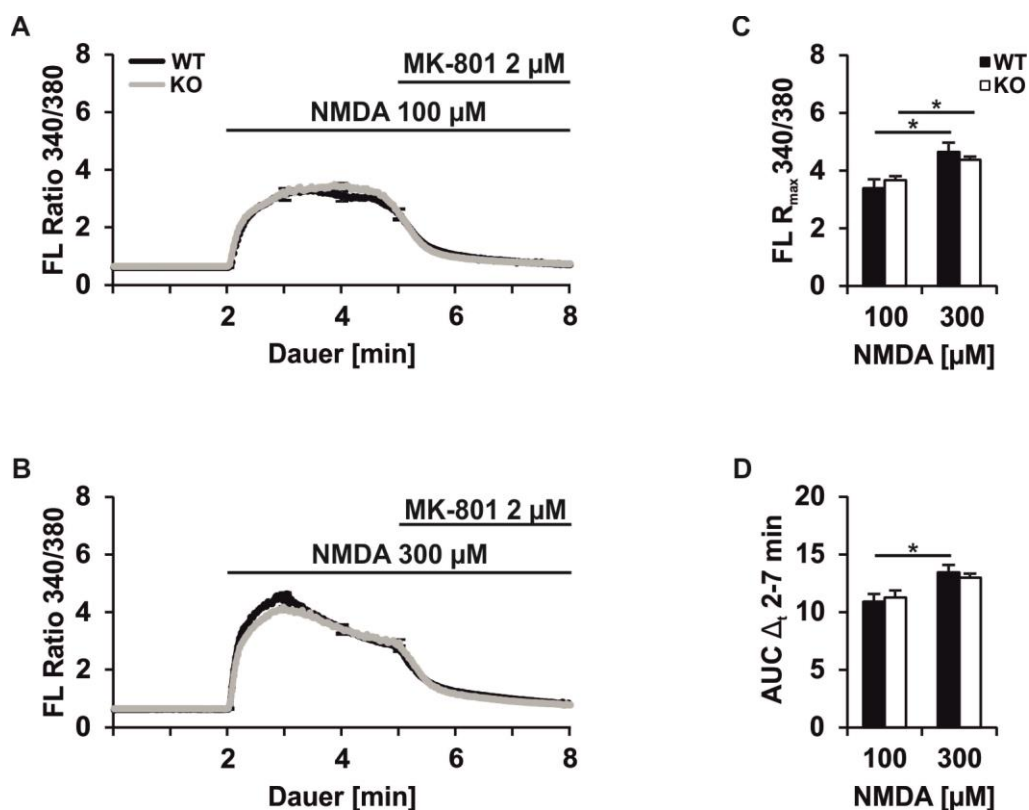
Unter Basalbedingungen war in den DIV 7 CGC-Kulturen kein genotypspezifischer Unterschied in der relativen mRNA-Expression der iGluR-Untereinheiten detektierbar (siehe Abbildung 4.9). Mittels qRT-PCR wurden relativ große mRNA-Expressionslevel an GluA2- sowie GluN1-Transkripten (GluA2 WT:  $0,4885 \pm 0,0638$ , Slack-KO:  $0,4746 \pm 0,0796$ ; GluN1 WT:  $0,3477 \pm 0,0411$ , Slack-KO:  $0,4022 \pm 0,0547$ ) nachgewiesen. Darüber hinaus ist die mRNA-Expression der GluA2-Untereinheit im Vergleich zu der von GluA1 (WT:  $0,0683 \pm 0,0089$ , Slack-KO:  $0,0685 \pm 0,0088$ ) signifikant größer (Signifikanz nicht gezeigt). Die Expressionsdaten deuten daraufhin, dass sowohl WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen hauptsächlich AMPA-Rezeptoren exprimieren die GluA2-Untereinheiten enthalten und somit impermeabel für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind. Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Zelle maßgeblich zum exzitotoxischen Zelltod beiträgt, ist es aufgrund dieses Befunds nicht verwunderlich, dass die spezifische Blockade von AMPA-Rezeptoren nur einen geringen Einfluss auf die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität hat (siehe Abbildung 4.6). Auch scheint die Deletion des Slack-Kanals in CGCs keinen Einfluss auf das alters- und entwicklungsabhängige Umschalten in der Expression der GluN2-Untereinheiten von GluN2A zu GluN2B zu haben. Entsprechend konnte zumindest an DIV 7 kein genotypspezifischer Unterschied in den mRNA-Expressionslevel von GluN2A (WT:  $0,0598 \pm 0,0080$ , Slack-KO:  $0,0626 \pm 0,0075$ ) und GluN2B (WT:  $0,0265 \pm 0,0028$ , Slack-KO:  $0,0233 \pm 0,0026$ ) festgestellt werden.

#### 4.3.5 Einfluss des Slack-Kanals auf den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg infolge der NMDA-Rezeptorstimulation

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -aktivierte Effektormechanismen spielen im Zuge der NMDA-Rezeptor-vermittelten neuronalen Schädigung sowie dem dadurch bedingten Zelltod eine wichtige Rolle (siehe 1.4) (Choi 1992, Meldrum 2000, Gillissen et al. 2002, Arundine und Tymianski 2003). Bekanntermaßen können  $\text{K}^+$ -Ionenkanäle, wie beispielsweise der  $\text{Na}^+$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal

Slack, durch ihre Membran re- bzw. hyperpolarisierenden Eigenschaften zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskaden beeinflussen. Daher sollte im Rahmen diese Arbeit untersucht werden, ob die genetische Ablation des Slack-Kanals in CGC-Kulturen zu veränderten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Leveln während der NMDA-Stimulation führt. Dazu wurden zwei unterschiedliche experimentelle Konfigurationen zur Bestimmung des NMDA-Rezeptor-induzierten Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  angewendet.

Zunächst wurde die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (FL Ratio 340/380) infolge der Stimulation der CGC-Kulturen mit 100  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  NMDA bestimmt (siehe 3.9.2). Dabei sollte der Einfluss der Slack-Deletion auf die NMDA-induzierte Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Level überprüft werden. Durch Co-Applikation des NMDA-Rezeptorblockers MK-801 sollte zudem untersucht werden, ob es sich dabei um einen NMDA-Rezeptor spezifischen Effekt handelt. Dies würde die in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Befunde, die einer Inhibierung der Neurotoxizität infolge der Blockade des NMDA-Rezeptors zeigen, belegen. Die Ergebnisse der Messungen der NMDA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung sind in Abbildung 4.10 dargestellt.



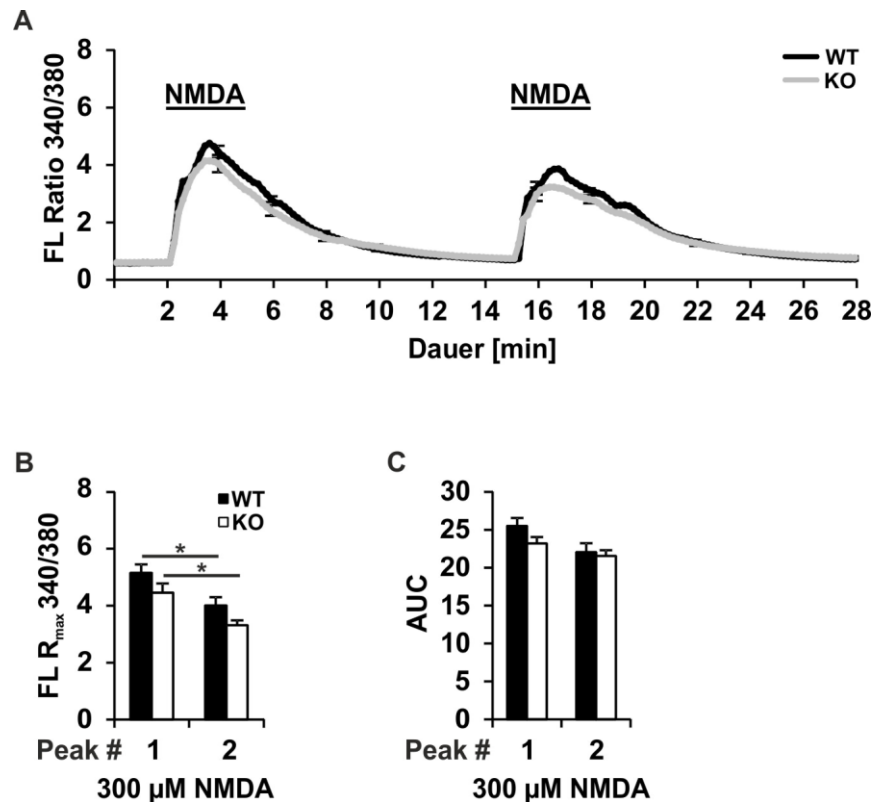
**Abbildung 4.10: Änderung der FL Ratio 340/380 in Abhängigkeit der NMDA-Stimulation**

Applikation von **A** 100  $\mu\text{M}$  und **B** 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung führt zur Zunahme der FL Ratio 340/380. Dieser Effekt kann durch die Co-Applikation des NMDA-Rezeptorblockers MK-801 antagonisiert werden. Das Ausmaß der Zunahme der FL Ratio 340/380 ist abhängig von der NMDA-Superfusion. **C** Der maximale Anstieg ( $R_{\text{max}}$ ) der FL Ratio 340/380 korreliert mit der Menge an appliziertem NMDA. WT und Slack-KO CGC-Kulturen zeigen einen signifikant größeren maximalen Anstieg nach Applikation von 300  $\mu\text{M}$  NMDA als nach 100  $\mu\text{M}$  NMDA-Superfusion. **D** Die Fläche unter der Messkurve (AUC) für das Messintervall  $\Delta_t = 2 - 7$  min ist für WT CGCs nach Applikation von 300  $\mu\text{M}$  NMDA signifikant größer als für 100  $\mu\text{M}$  NMDA. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; 100  $\mu\text{M}$ : WT n=6/23 und Slack-KO n=4/14; 300  $\mu\text{M}$ : WT n=6/19 und Slack-KO n=4/12; \*  $p < 0,05$ )

Durch die NMDA-vermittelte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren kommt es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Dies führt zum Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wodurch sich das Verhältnis von freiem zu mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen komplexierten Fura-2 in Richtung Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex verschiebt. Dieser wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt. Daher kann infolge des Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eine Zunahme des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität bei Anregungswellenlängen von 340 nm bzw. 380 nm (FL Ratio 340/380) verzeichnet werden. In Abbildung 4.10 A und B ist die Änderung der FL Ratio 340/380 gegen die Messdauer aufgetragen. Das innerhalb der ersten 2 min bestimmte Fluoreszenzverhältnis, welches während der konstanten Zufuhr von Erhaltungsmedium bestimmt wird, widerspiegelt die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dabei konnten keine genotypabhängigen Unterschiede festgestellt werden. Anschließend erfolgt die 3-minütige Applikation von entweder 100  $\mu\text{M}$  (siehe Abbildung 4.10 A) bzw. 300  $\mu\text{M}$  (siehe Abbildung 4.10 B) NMDA-Lösung. Direkt nach Beginn dieser NMDA-Inkubationsphase kommt es bedingt durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einem schnellen Anstieg der FL Ratio 340/380. Dabei korreliert das Ausmaß des Anstiegs der Fluoreszenzratio mit der Menge an appliziertem NMDA. So ist die Zunahme der Ratio bei 300  $\mu\text{M}$  NMDA deutlich größer als bei 100  $\mu\text{M}$  (siehe Abbildung 4.10 A und B). Der Verlauf der Messkurven von WT bzw. Slack-KO CGCs hingegen ist nahezu deckungsgleich. Interessanterweise kann für CGC-Kulturen beider Genotypen während der andauernden Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA-Lösung eine leichte Abnahme der Fluoreszenzratio beobachtet werden. Diese Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  könnte auf eine Desensibilisierung der NMDA-Rezeptoren oder aber die Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazelluläre Speicher hindeuten. Im Anschluss an die NMDA-Stimulation erfolgt die Co-Applikation von NMDA in Kombination mit 2  $\mu\text{M}$  MK-801-Lösung. Die gleichzeitige Superfusion des NMDA-Rezeptorantagonisten führt zur zügigen Abnahme des Fluoreszenzverhältnisses 340/380 in Gegenwart von NMDA. Diese Beobachtung ist auf die nicht-kompetitive Blockade der NMDA-Rezeptoren durch MK-801 zurückzuführen. Nach einer Versuchsdauer von ca. 7 min ist das Fluoreszenzverhältnis der WT und Slack-KO CGC-Kulturen, welches stellvertretend für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration steht, wieder auf dem Basalniveau angelangt. Dabei ist die MK-801-induzierte Abnahme der FL Ratio 340/380 unabhängig von der maximalen Ratio ( $R_{\text{max}}$ ). Zwar können nach Applikation von 300  $\mu\text{M}$  NMDA signifikant höherer FL Ratio 340/380 Werte als nach 100  $\mu\text{M}$  NMDA Superfusion ( $t = 5$  min) beobachtet werden, jedoch kommt es trotz dieses konzentrationsabhängigen Unterschieds im Verlauf der MK-801 Superfusion zu einer vergleichbaren Abnahme der FL Ratio 340/380. Alle in Abbildung A und B dargestellten Kurven erreichen zum gleichen Zeitpunkt ( $t = 7$  min) wieder das Basalniveau und somit die gleiche  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Neben dem Fluoreszenzverhältnis wurde für beide Versuchsansätze auch der maximale Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses (FL  $R_{\text{max}}$  340/380) sowie die AUC nach Superfusion mit NMDA-haltiger Pufferlösung bestimmt. Für die Bestimmung der  $R_{\text{max}}$  wird die

Differenz zwischen maximaler FL Ratio 340/380 und der *Baseline* (FL Ratio 340/380 für  $\Delta t = 0 - 2$  min) berechnet, die Analyse der AUC erfolgt für das Messintervall  $\Delta t = 2 - 7$  min. Die Ergebnisse dieser beiden Quantifizierungsmethoden sind in Abbildung 4.10 C und D dargestellt. Diese zeigen für WT CGCs eine signifikante Zunahme der  $R_{max}$  sowie der AUC in Abhängigkeit von der NMDA-Konzentration (100  $\mu$ M NMDA:  $R_{max}$ :  $3,39 \pm 0,31$ , AUC:  $10,91 \pm 0,66$ ; 300  $\mu$ M NMDA:  $R_{max}$ :  $4,65 \pm 0,32$ , AUC:  $13,44 \pm 0,63$ ). Für die Slack-KO CGCs kann bei Applikation von 300  $\mu$ M im Vergleich zu 100  $\mu$ M NMDA ebenfalls ein Anstieg dieser beider Parameter beobachtet werden. Jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (100  $\mu$ M NMDA:  $R_{max}$ :  $3,66 \pm 0,15$ , AUC:  $11,27 \pm 0,60$ ; 300  $\mu$ M NMDA:  $R_{max}$ :  $4,37 \pm 0,11$ , AUC:  $12,97 \pm 0,35$ ). Auch ergeben sich für keinen dieser Parameter signifikante genotypabhängige Unterschiede. Dies führt zur Annahme, dass Slack unter den gewählten Versuchsbedingungen (3-minütige NMDA-Rezeptorstimulation) keinen Einfluss auf die NMDA-induzierte Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  hat.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden die WT und Slack-KO Kulturen wiederholt mit 300  $\mu$ M NMDA superfundiert (Versuchsdurchführung siehe 3.9.2). Dabei sollte untersucht werden, ob sich bei repetitiver Stimulation Slack-abhängig Unterschiede in der Aktivierbarkeit bzw. Desensibilisierung der NMDA-Rezeptoren ergeben. Einige Arbeiten beschreiben auch, dass eine wiederholte Stimulation mit exzitotoxischen Glutamatkonzentrationen zu einer anhaltenden Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führt (Glaum und Miller 1992). Zur Analyse der Daten dieser Messreihe wurden die gleichen Parameter wie in Abbildung 4.10 dargestellt bestimmt (siehe Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: Bestimmung der FL Ratio 340/380 bei wiederholter NMDA-Stimulation**

**A** Darstellung der FL Ratio 340/380 im Verlauf der wiederholten Superfusion der CGC-Kulturen mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA für jeweils 3 min. **B** Sowohl in WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen ist der maximale Anstieg ( $R_{\text{max}}$ ) der FL Ratio 340/380 für den ersten Peak signifikant größer als für den zweiten Peak. Die Unterschiede zwischen den Genotypen waren nicht signifikant. **C** Die Fläche unter der Messkurve (AUC) für das Messintervall  $\Delta_t = 2 - 15$  min (Peak 1) ist für CGCs beider Genotypen größer als die AUC für das Messintervall  $\Delta_t = 15 - 28$  min (Peak 2). (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT  $n=5/14$  und Slack-KO  $n=5/16$ ; \*  $p < 0,05$ )

Die ersten 2 min der in Abbildung 4.11 A dargestellten FL Ratio 340/380 dienen erneut der Bestimmung des Fluoreszenzverhältnisses von an  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem zu ungebundenem Fura-2-AM unter Basalbedingungen (Basalniveau). Anschließend erfolgt die erste Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  NMDA. Nach einer 10-minütigen Auswaschphase mit Erhaltungsmedium erfolgte die wiederholte Superfusion mit NMDA-haltiger Pufferlösung. Dem schließt sich eine zweite Auswaschphase von erneut 10 min an. Die Verläufe der Messkurven von WT und Slack-KO CGC-Kulturen sind sowohl für die erste als auch zweite Stimulations- bzw. Auswaschphasen nahezu identisch. Erneut war direkt nach Beginn der Superfusion mit NMDA-Lösung ein schneller Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses 340/380 und somit eine Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu beobachten. Dabei wird nach 1- bis 2-minütiger NMDA-Zufuhr ( $t = 3 - 4$  min und  $t = 15 - 18$  min) ein Maximum des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität bei 340/380 erreicht. Anschließend ist wie im Experiment zuvor auch eine leichte Abnahme der Fluoreszenzratio trotz andauernder Stimulation mit NMDA zu beobachten. Diese Abnahme in der Ratio steht für eine verminderte Konzentration freier intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, was eventuell durch eine Desensibilisierung der NMDA-Rezeptoren

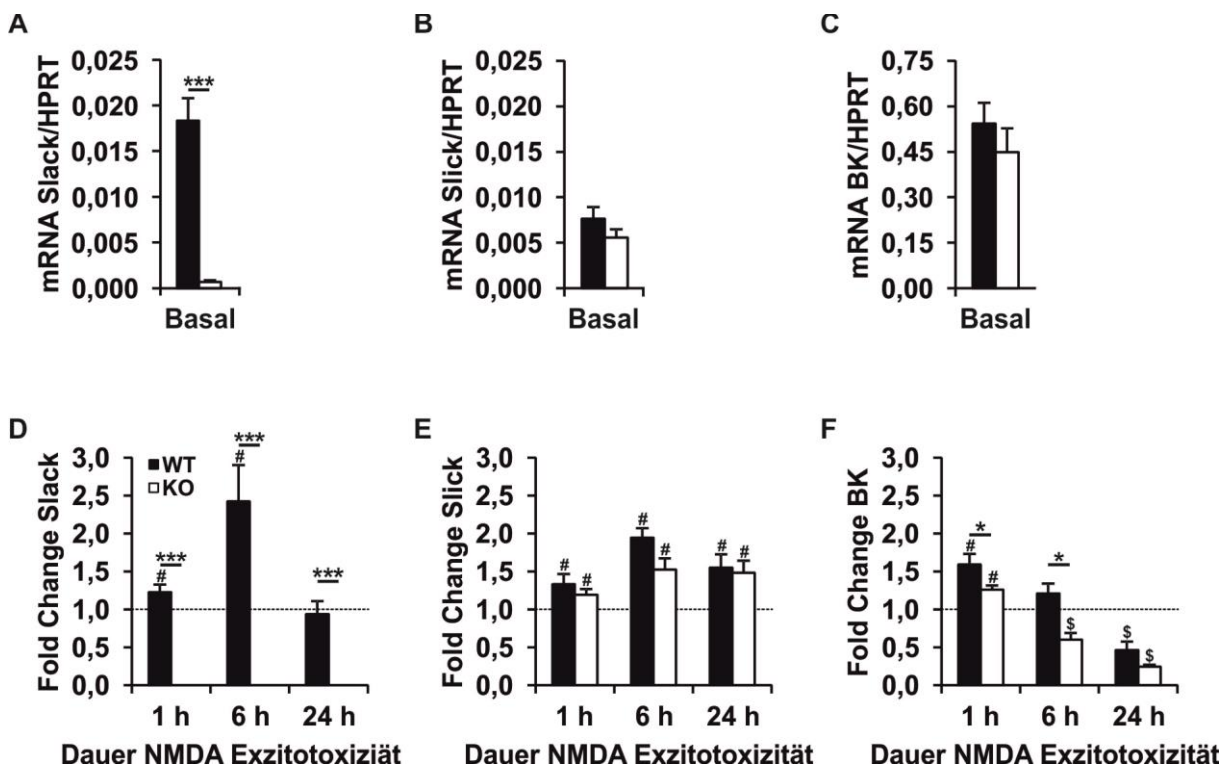
und den dadurch bedingten verminderten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  begründet werden kann. Während der ersten Auswaschphase mit Erhaltungsmedium kommt es in den Kulturen beider Genotypen erwartungsgemäß zur Abnahme der Fluoreszenzratio. Nach Erreichen des Basisniveaus erfolgt die zweite Superfusion mit NMDA-Pufferlösung. Sowohl in WT als auch Slack-KO CGCs war der Maximalwert der Fluoreszenzratio nach wiederholter NMDA Superfusion niedriger (siehe auch Abbildung 4.11 B). Entsprechend waren die  $R_{\text{max}}$ -Werte beider Genotypen für den ersten Peak signifikant größer (WT:  $5,15 \pm 0,31$ ,  $p = 0,042$ ; Slack-KO:  $4,46 \pm 0,32$ ,  $p = 0,024$ ) als für den zweiten Peak (WT:  $4,01 \pm 0,29$ ; Slack-KO:  $3,32 \pm 0,17$ ). Außerdem ist eine Tendenz zu einem genotypabhängigen Unterschied im Verlauf der Fluoreszenzmesskurven zu beobachten. Wie in Abbildung 4.11 A dargestellt verläuft die Messkurve der FL Ratio 340/380 der Slack-KO CGCs während des gesamten Messzeitraums leicht unterhalb der Kurve der WT CGCs. Diese Differenz in der FL Ratio 340/380 konnte durch die Analyse der  $R_{\text{max}}$  bestätigt werden (siehe Abbildung 4.11 B). Auch die AUCs der Messkurven beider Genotypen differieren leicht voneinander. So wurden für Slack-KO CGC-Kulturen kleinere Werte (Peak 1:  $23,18 \pm 0,83$ ; Peak 2:  $21,54 \pm 0,78$ ) berechnet als für WT CGCs (Peak 1:  $25,50 \pm 1,04$ ; Peak 2:  $22,06 \pm 1,15$ ). Keiner der vorbezeichneten Unterschiede zwischen den Genotypen erreichte das Signifikanzniveau.

#### **4.3.6 Expressionsanalyse neuronal exprimierter Slo-Kaliumkanäle nach NMDA-Exzitotoxizität**

Neben dem Slack-Kanal werden noch zwei weitere Vertreter der Slo-Kaliumkanalfamilie, der Slick- und BK-Kanal, neuronal exprimiert. Dem BK-Kanal wurde im Rahmen verschiedener Experimente bereits eine neuroprotektive Rolle zugesprochen (Kulawiak et al. 2008, Liao et al. 2010, Mancini et al. 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivierung von Slack- und Slick-Kanälen zur anhaltenden Hyperpolarisation der Zellmembran und somit zur Regulation der neuronalen Erregbarkeit beiträgt.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann als *second messenger* Molekül zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führen und so die Expression unterschiedlicher Gene beeinflussen (Sheng et al. 1990, Xia et al. 1996). Bekanntermaßen kommt es im Verlauf exzitotoxischer Prozesse zur Regulation der Genexpression. So wurde infolge exzessiver NMDA-Stimulation beispielsweise eine Hochregulation sogenannter *immediate early genes* beobachtet (Shan et al. 1997). Aufgrund dessen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob es im Laufe der NMDA-induzierten Exzitotoxizität zu Veränderungen in der Expression der neuronal exprimierten Slo-Kaliumkanäle kommt. Eine gesteigerte Genexpression der Slo-Transkripte sowie eine nachfolgend erhöhte Abundanz der Kanäle wären ein denkbarer Gegenregulationsmechanismus bei Exzitotoxizität. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden vor Beginn (0 h, Basal) sowie



nach einer Inkubationsdauer von 1 h, 6 h und 24 h mit 300  $\mu$ M NMDA-Lösung RNA-Proben von WT und Slack-KO CGC-Kulturen isoliert. Anschließend wurden die mRNA-Expressionslevel von Slack, Slick und BK zum Zeitpunkt der Probenisolation bestimmt (Material und Versuchsdurchführung siehe 2.2.7 und 3.7). Die Ergebnisse der Expressionsanalysen unter Basalbedingungen sowie in Abhängigkeit der NMDA-induzierten Exzitotoxizität sind in Abbildung 4.12 dargestellt.



**Abbildung 4.12: Expressionsanalyse der Slo-Kaliumkanäle unter Basalbedingungen und im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität**

Relative mRNA-Expressionslevel von **A** Slack, **B** Slick und **C** BK in WT und Slack-KO CGC-Kulturen unter basalen Kultivierungsbedingungen. Veränderung der Expressionslevel (*Fold Change*, FC) von **A** Slack, **B** Slick und **C** BK, in Abhängigkeit der Dauer der NMDA-Exzitotoxizität in WT und Slack-KO CGC-Kulturen. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT  $n=6-8$  und Slack-KO  $n=8-9$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; # steht für die Zunahme ( $p < 0,05$ ) und \$ für Abnahme ( $p < 0,05$ ) der Expressionslevel im Vergleich zur basalen Expression).

Slack-mRNA-Transkripte waren in den WT CGCs ( $0,0183 \pm 0,0025$ ) aber nicht in den entsprechenden Slack-KO Kulturen nachweisbar (siehe 4.2.2 und Abbildung 4.12 A). Außerdem bestätigen die hier dargestellten Befunde die mRNA-Expression der ebenfalls zur Slo-Genfamilie zählenden Slick- und BK-Kanäle in CGCs (siehe Abbildung 4.12 B und C). Offensichtlich hat die genetische Ablation von Slack keinen Einfluss auf die basale mRNA-Expression der verwandten Ionenkanäle. Die detektierten mRNA-Expressionslevel von Slick (WT:  $0,0076 \pm 0,0013$ , Slack-KO:  $0,0056 \pm 0,0009$ ) sind etwas geringer als die von Slack. Im Gegensatz dazu konnten hohe BK-mRNA-Expressionslevel in den kultivierten CGCs beider Genotypen nachgewiesen werden (WT:  $0,5434 \pm 0,0678$ , Slack-KO:  $0,4489 \pm 0,0788$ ).

Dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachte Expressionsnachweis von BK-mRNA in cerebellären Neuronen bestätigt bereits publizierte Befunde, die mittels IF- und DAB-Färbung eine Expression des Kanals in cerebellären Granularzellen nachgewiesen haben (Sausbier et al. 2005).

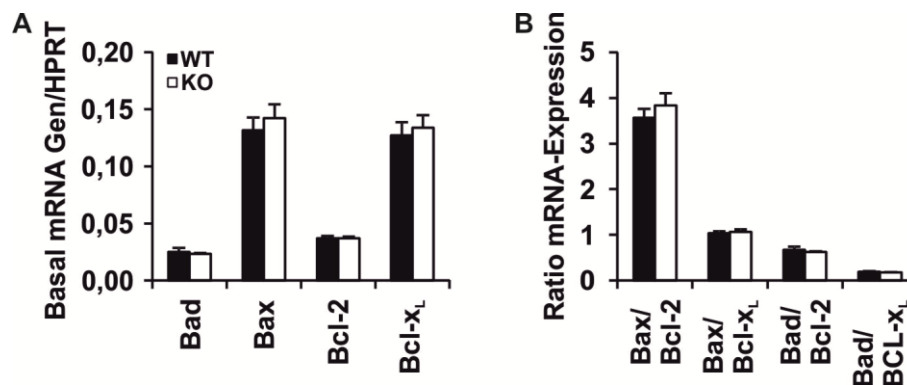
Im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizitätsstudien kommt es zu einer Zunahme der Slack-mRNA-Expressionslevel (siehe Abbildung 4.12 D). Bereits nach 1 h (FC WT:  $1,2262 \pm 0,1028$ ), insbesondere jedoch nach 6 h NMDA-Applikation (FC WT:  $2,4248 \pm 0,4790$ ) kann eine signifikante Steigerung der Slack-mRNA-Expressionslevel verzeichnet werden. Nach 24 h NMDA-Exposition entsprechen die Expressionslevel (FC WT:  $0,9389 \pm 0,1707$ ) wieder dem Basalniveau. Entsprechend der Erwartungen ist zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Expression von Slack-mRNA in Slack-KO Kulturen nachweisbar.

Für die Änderung der Slick-mRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit der NMDA-Stimulation kann ein simultaner Verlauf wie für Slack beobachtet werden (siehe Abbildung 4.12 E). Dabei sind keine genotypabhängigen Unterschiede in der Zunahme der Expressionslevel detektierbar. Bereits nach 1 h NMDA-Inkubation ist in WT und Slack-KO CGC-Kulturen eine geringe, aber dennoch signifikante Zunahme der Slick-mRNA-Expressionslevel erkennbar (FC WT:  $1,3309 \pm 0,1338$ ; FC Slack-KO:  $1,1956 \pm 0,0718$ ). Nach 6 h NMDA-Stimulation ist der *Fold Change* im Vergleich zur basalen Expression am größten (FC WT:  $1,9467 \pm 0,1243$ ; FC Slack-KO:  $1,5255 \pm 0,1473$ ). Die Slick-Expressionslevel beider Genotypen nehmen nach einer Inkubationsdauer von 24 h wieder ab, sind im Vergleich zur Expression unter Kontrollbedingungen jedoch immer noch signifikant erhöht (FC WT:  $1,5509 \pm 0,1741$ ; FC Slack-KO:  $1,4827 \pm 0,1586$ ). Diese Expressionsanalyse zeigt auf, dass es weder unter Basalbedingungen noch während exzitotoxischer Stimulation zu einer kompensatorischen Regulation der Slick-mRNA-Expression in den Slack-KO Kulturen kommt.

Analog zu den Expressionsdaten von Slack und Slick ist nach 1 h NMDA-Inkubation eine signifikante Zunahme der BK-mRNA-Expression festzustellen (FC WT:  $1,5927 \pm 0,1363$ ; FC Slack-KO:  $1,2618 \pm 0,0545$ ) (siehe Abbildung 4.12 F). Im Gegensatz zu den Slack- und Slick-mRNA-Leveln nimmt die mRNA-Expression von BK im Verlauf der Exzitotoxizität nicht weiter zu. Nach 6 h Inkubation mit NMDA kann im WT eine geringe Reduktion der BK-mRNA-Expressionslevel im Vergleich zu den Expressionsleveln nach 1 h NMDA nachgewiesen werden (FC WT:  $1,2094 \pm 0,1309$ ). Die BK-mRNA-Expressionslevel der Slack-KO Kulturen sind im Vergleich zur basalen BK-Expression zu diesem Zeitpunkt sogar signifikant reduziert (FC Slack-KO:  $0,6037 \pm 0,0853$ ). Nach 24 h NMDA-Exzitotoxizität werden sowohl im Slack-KO als auch im WT signifikant reduzierte BK-mRNA-Expressionslevel (FC WT:  $0,4644 \pm 0,1135$ , FC Slack-KO:  $0,2438 \pm 0,0280$ ) detektiert.

### 4.3.7 Einfluss der Slack-Ablation auf die mRNA-Transkription pro- und anti-apoptotischer Faktoren

Wie in Abschnitt 1.4 ausführlich geschildert kommt es im Zuge der Exzitotoxizität zu nekrotischen und apoptotischen Zelltodmechanismen. Optisch lassen sich diese beiden schädigenden Prozesse in der Regel leicht voneinander unterscheiden. So führt die Nekrose zu einer Schwellung der Zelle sowie der Zellorganellen und zur Ruptur der Plasmamembran, während es im Rahmen der Apoptose zur Kondensation des Zellkerns sowie dem Abbau der DNA durch Endonukleasen kommt (siehe 1.4.4). Da mittels LDH-Assay hauptsächlich der Anteil an nekrotischem Zelltod bestimmt wird, war es von großem Interesse auch Prozesse zu untersuchen die zum apoptotischen Zelltod beitragen. Aufgrund dessen wurden die mRNA-Expressionslevel von Proteinen der Bcl-2 Familie in Abhängigkeit von der Dauer der NMDA-Exzitotoxizität untersucht. Hierbei lag der Fokus v. a. auf der mRNA-Expressionsanalyse der antiapoptotisch agierenden Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Faktoren sowie der Apoptose-fördernden Proteine Bax und Bad. Die relativen mRNA-Expressionslevel in Bezug auf HPRT, sowie die Änderung der Expression dieser im Verlauf der Exzitotoxizität sind in Abbildung 4.13 bzw. Abbildung 4.14 dargestellt.



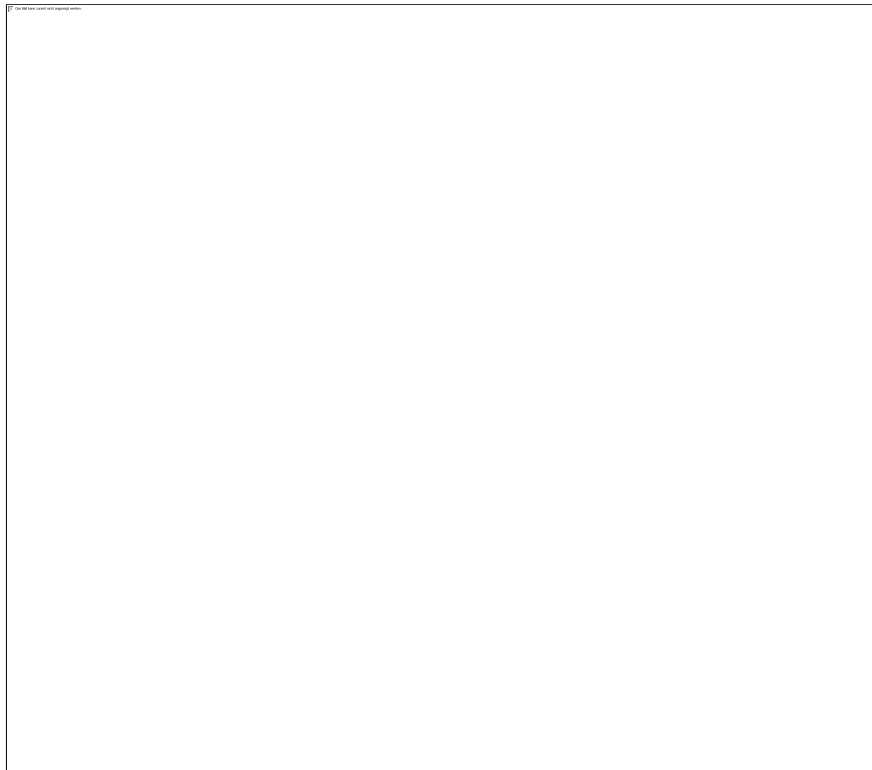
**Abbildung 4.13: Expressionsanalyse verschiedener pro- und antiapoptotischer Gene**

**A** Relative mRNA-Expressionslevel der proapoptotischen Proteine Bad und Bax sowie der Apoptose-Repressoren Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> unter basalen Kultivierungsbedingungen. **B** Ratios der mRNA-Expressionslevel der pro-/antiapoptotischen Faktoren. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=5).

Die Expressionsanalyse der basalen mRNA-Expressionslevel von Bad, Bax, Bcl-2 sowie Bcl-x<sub>L</sub> offenbaren unter Kultivierungsbedingungen keine genotypspezifischen Unterschiede in den mRNA-Level. In WT sowie Slack-KO CGC-Kulturen können im Vergleich zur mRNA-Expression von Bax (WT:  $0,1315 \pm 0,0114$ ; Slack-KO:  $0,1422 \pm 0,0120$ ) und Bcl-x<sub>L</sub> (WT:  $0,1271 \pm 0,0116$ ; Slack-KO:  $0,1338 \pm 0,0109$ ) nur geringe Mengen an Bad (WT:  $0,0250 \pm 0,0036$ , Slack-KO:  $0,0232 \pm 0,0010$ ) und Bcl-2-mRNA (WT:  $0,0369 \pm 0,0021$ , Slack-KO:  $0,0370 \pm 0,0015$ ) detektiert werden. Diese Apoptose-beeinflussenden Proteine, deren Genexpression im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, können einerseits Homo-

und andererseits Heterodimer ausbilden. Bekannterweise kommt es durch die Bildung von Heterodimeren, bestehend aus dem proapoptotischen Bax-Protein und den Apoptose-Repressoren Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>, zur Hemmung des programmierten Zelltods. Sie fungieren somit als Antagonisten zu dem Bax-Homodimeren (Oltval et al. 1993, Andreu-Fernández et al. 2017). Die Bindung von Bad an Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> hingegen führt zur Deaktivierung der Apoptose-inhibierenden Eigenschaften dieser Proteine. Offensichtlich beeinflussen die Bax-/Bad- und Bcl-2-/Bcl-x<sub>L</sub>-Expression das Zellüberleben bzw. den programmierten Zelltod. So hat das Verhältnis dieser pro- bzw. antiapoptotischen Proteine unter physiologischen Bedingungen Einfluss auf die Sensitivität der Neurone gegenüber Apoptose-induzierenden Reizen (Gross et al. 1999, Bar-Am et al. 2005, Hardwick und Soane 2013). Unter basalen Kultivierungsbedingungen war kein Unterschied in den mRNA-Verhältnissen der anti- und proapoptotischen Faktoren erkennbar (siehe Abbildung 4.14). Dies lässt vermuten, dass auch auf Proteinebene keine Expressionsunterschiede der Proteine, die aus den entsprechenden mRNA-Transkripten abgeleitet werden, existieren und damit die WT bzw. Slack-KO Kulturen keine genotypabhängige Prädisposition gegenüber apoptotischem Zelltod aufweisen.

Nachfolgend wurde ermittelt ob sich für WT und Slack-KO CGCs während der NMDA-induzierten Exzitotoxizität Änderungen in den mRNA-Expressionslevel der vorbezeichneten pro- bzw. antiapoptotischen Faktoren ergeben. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.14 dargestellt.



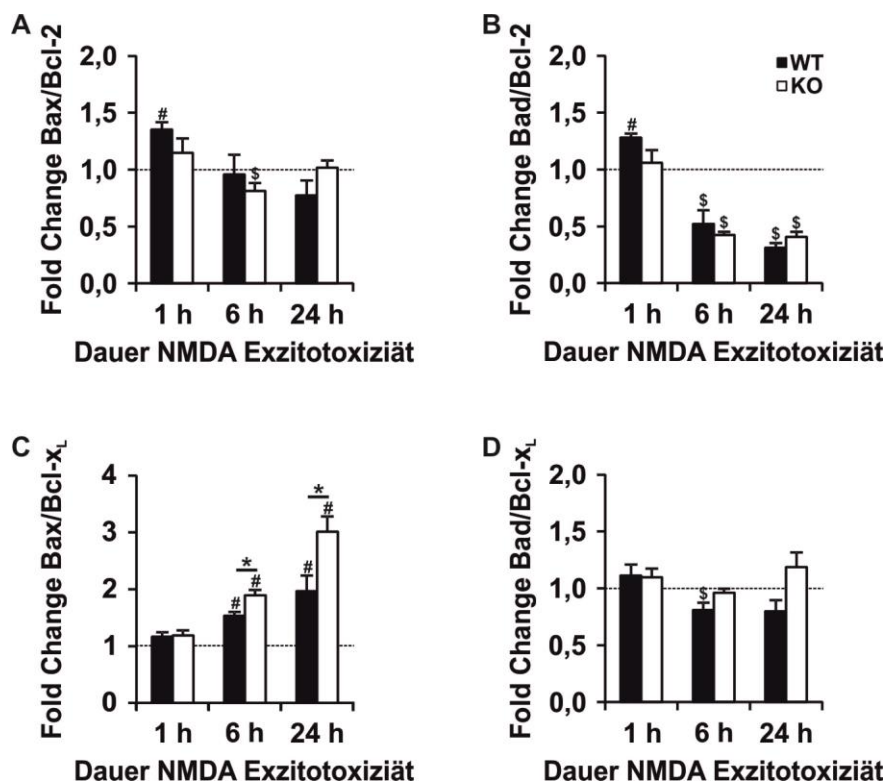
**Abbildung 4.14: Expressionsverlauf pro-/antiapoptotischer Gene während NMDA-Exzitotoxizität**

Veränderung der Expressionslevel (*Fold Change, FC*) der proapoptotischen Faktoren **A** Bad und **B** Bax sowie der antiapoptotischen Faktoren **C** Bcl-2 und **D** Bcl-x<sub>L</sub> in Abhängigkeit der Dauer der NMDA-Exzitotoxizität in WT und Slack-KO CGC-Kulturen. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=5; \*  $p < 0,05$ ; # steht für die Zunahme ( $p < 0,05$ ) und \$ für die Abnahme ( $p < 0,05$ ) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

In WT CGC-Kulturen kann bereits nach 1 h NMDA-Exzitotoxizität eine anhaltende Hochregulation der proapoptotischen Bax-mRNA-Expressionslevel (FC 1 h:  $1,7827 \pm 0,1985$ ; FC 24 h:  $1,7096 \pm 0,3579$ ) festgestellt werden. Dahingegen wird für Slack-KO Kulturen erst nach 24 h eine Zunahme der Bax-mRNA-Level beobachtet (FC 1 h:  $1,3121 \pm 0,1607$ ; FC 24 h:  $1,7291 \pm 0,1619$ ). Die Bad-mRNA-Expressionslevel in WT CGC-Kulturen sind nach 1 h Exzitotoxizität ebenfalls signifikant erhöht (FC 1 h:  $1,6678 \pm 0,1082$ ), wohingegen in Slack-KO Kulturen kein Anstieg der mRNA-Level nachgewiesen werden kann (FC 1h:  $1,1859 \pm 0,0856$ ). Im Verlauf der weiteren NMDA-Stimulation kommt es sowohl in WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen zu einer Abnahme der Bad-mRNA-Expression. Zudem zeigen die Kulturen beider Genotypen im Vergleich zur basalen Expression nach 6 h und 24 h Exzitotoxizität signifikante höhere Bcl-2-mRNA-Level (WT FC 6 h:  $1,5534 \pm 0,0541$ ; FC 24 h:  $2,1872 \pm 0,1529$ ; Slack-KO FC 6 h:  $1,2859 \pm 0,0669$ ; FC 24 h:  $1,6952 \pm 0,1174$ ). Dabei werden nach 6 h signifikante genotyabhängige Unterschiede verzeichnet. Auch die Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Level steigen in WT CGC-Kulturen nach 1 h NMDA-Inkubation signifikant an (FC 1 h:  $1,5631 \pm 0,2059$ ). Im Slack-KO hingegen ist zu diesem Zeitpunkt keine Veränderung der mRNA-Expression von Bcl-x<sub>L</sub> nachweisbar (FC 1 h:  $1,1029 \pm 0,1069$ ).

Nach 6 h und 24 h NMDA-Inkubation kommt es in den Kulturen beider Genotypen zu einer Abnahme der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Level. Diese Abnahme der mRNA-Expression ist zu beiden Zeitpunkten nur in Slack-KO CGC-Kulturen signifikant (WT FC 6 h:  $0,9503 \pm 0,1568$ ; FC 24 h:  $0,8949 \pm 0,1716$ ; Slack-KO FC 6 h:  $0,5610 \pm 0,0756$ , FC 24 h:  $0,5924 \pm 0,0670$ ).

Wie bereits erwähnt spielt das Expressionsverhältnis von proapoptotischen Faktoren zu Apoptose-Repressoren eine entscheidende Rolle für das Zellüberleben. So kommt es in der Regel im Rahmen pathophysiologischer Prozesse, wie beispielsweise infolge ischämischer Zustände, zur Hochregulierung der Bax-/Bad-Proteinexpression. Die Expression antiapoptotischer Faktoren (z. B. Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub>) hingegen bleibt währenddessen konstant oder nimmt sogar ab. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Faktoren in Richtung Apoptose-induzierender Prozesse und es kommt zur verstärkten Bildung von Bax-Homodimeren (Gross et al. 1999, Billen et al. 2008, Andreu-Fernández et al. 2017). Daher wurde untersucht ob die genetische Ablation von Slack im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität einen Einfluss auf die Verhältnisse von Bax/Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub>, sowie von Bad/Bcl-2 bzw. Bcl-x<sub>L</sub> hat (siehe Abbildung 4.15).



**Abbildung 4.15: Änderung im Expressionsverhältnis von pro-/antiapoptotischen Genen**

Änderungen des Verhältnisses von **A** Bax/Bcl-2, **B** Bad/Bcl-2, **C** Bax/Bcl-x<sub>L</sub> und **D** Bad/Bcl-x<sub>L</sub> im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=5; \* p < 0,05; # steht für die Zunahme (p < 0,05) und \$ für die Abnahme (p < 0,05) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

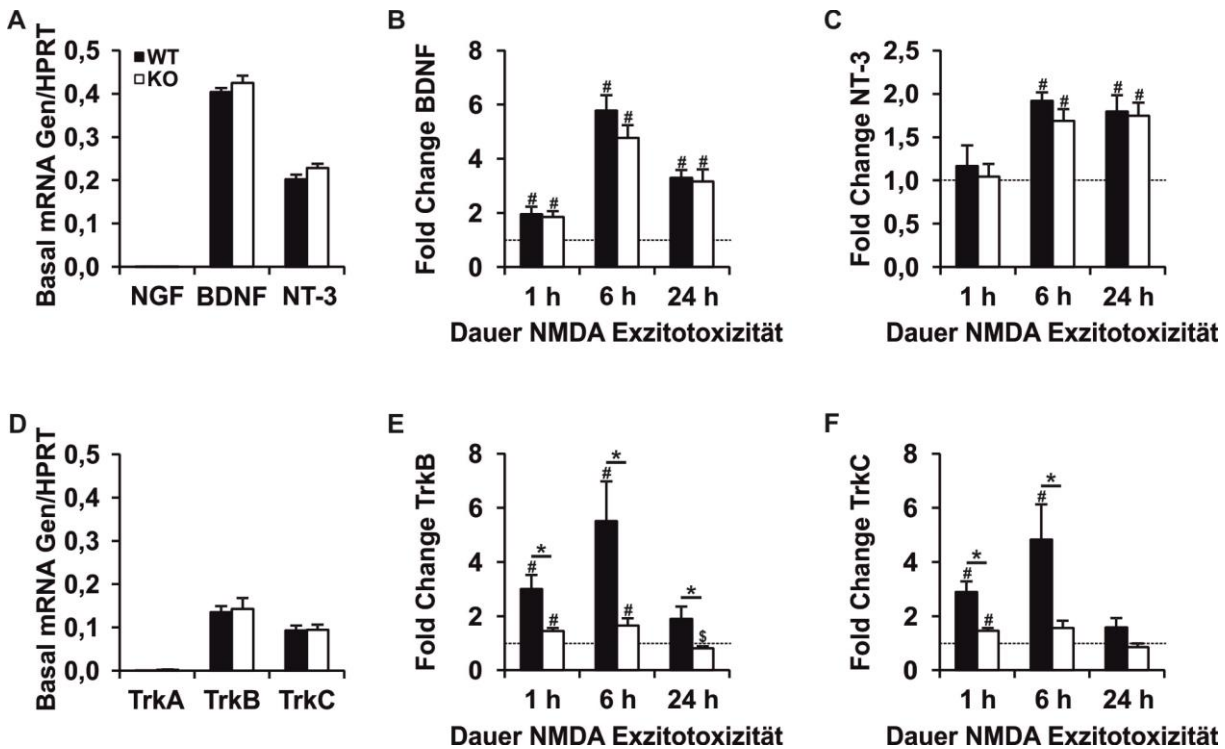
Im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses der proapoptotischen Bax-mRNA und antiapoptotischen Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA (siehe Abbildung 4.15 B). Während nach 1 h Inkubation mit NMDA das Bax/Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Verhältnis (WT FC: 1,1660 ± 0,0781; Slack-KO FC: 1,1873 ± 0,0933) annähernd unverändert ist, kommt es im Verlauf der exzitotoxischen Stimulation v. a. in Slack-KO CGC-Neuronen zu einer Zunahme von Bax/Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA. Dabei ergibt sich nach 6 h sowie nach 24 h ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied in der Bax/Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Ratio (WT FC 6 h: 1,5362 ± 0,065; FC 24 h: 1,9663 ± 0,2747; Slack-KO FC 6 h: 1,8924 ± 0,0969; FC 24 h: 3,0119 ± 0,2688). Dieser Unterschied für Bax/Bcl-x<sub>L</sub> ergibt sich aus dem NMDA-abhängigen Anstieg der Bax-mRNA-Expressionslevel und der gleichzeitigen Abnahme der Bcl-x<sub>L</sub>-mRNA-Expression (siehe Abbildung 4.14 A und D). Dieser Befund liefert einen ersten Hinweis auf eine vermehrte Formation proapoptotischer Bax-Homomere in Slack-KO CGCs und impliziert, dass Slack an der Regulation apoptotischer Mechanismen wie der Ausbildung von Bax-Homomere beteiligt sein könnte. Letztere bilden eine große Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch es zur Freisetzung Apoptose-auslösender Faktoren wie z. B. Cytochrom C kommt (siehe 1.4.4). Da diese Hypothese sich bislang ausschließlich auf Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse stützt, ist zukünftig eine Verifizierung dieser Daten auf Proteinebene erforderlich.

#### **4.3.8 Slack-Ablation vermindert die mRNA-Transkription von Neurotrophin-Rezeptoren**

Neurotrophine können als endogene Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Entwicklung, das neuronale Überleben und die Funktion des Nervensystems nehmen (Snider und Johnson 1989, Eide et al. 1993, Korsching 1993, Lewin und Barde 1996, Segal und Greenberg 1996). Einige Neurotrophine, im insbesondere BDNF, werden bei exzitotoxischer Schädigung hochreguliert und können unter diesen Bedingungen eine neuroprotektive Rolle einnehmen (Lindholm et al. 1993, Cheng und Mattson 1994, Almeida et al. 2005). Diese Befunde bildeten die Grundlage für die Untersuchung der mRNA-Expression der neurotrophen Faktoren NGF, BDNF und NT-3 sowie der korrespondierenden Trk-Rezeptoren (TrkA, TrkB und TrkC) unter basalen Bedingungen und im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität (siehe 4.3.3). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

In kultivierten cerebellären Granularzellen von WT und Slack-KO Tieren können weder NGF-mRNA-Expressionslevel noch mRNA des korrespondierenden TrkA-Rezeptors nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.16 A und D). Im Gegensatz dazu werden in CGC-Kulturen beider Genotypen mRNA-Transkripte der beiden neurotrophen Faktoren BDNF (WT: 0,4039 ± 0,0093; Slack-KO: 0,4246 ± 0,0173) und NT-3 (WT: 0,2022 ± 0,0107; Slack-KO: 0,2285 ± 0,0094) exprimiert (siehe Abbildung 4.16 A). Darüber hinaus können in

WT und Slack-KO Kulturen mRNA-Level der Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkB (WT:  $0,1352 \pm 0,0143$ ; Slack-KO:  $0,1427 \pm 0,0254$ ) und TrkC (WT:  $0,0936 \pm 0,0110$ , Slack-KO:  $0,0950 \pm 0,0114$ ) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.16 D). Dabei können unter basalen Kultivierungsbedingungen keine genotypspezifischen Unterschiede bei den mRNA-Expressionsleveln der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren festgestellt werden.



#### Abbildung 4.16: Expressionsanalyse verschiedener Neurotrophine und ihrer Rezeptoren

**A** Relative mRNA-Expressionslevel der Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 und **D** ihrer Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC unter basalen Kultivierungsbedingungen. Änderungen in den mRNA-Expressionsleveln von **B** BDNF, **C** NT-3, **E** TrkB und **F** TrkC im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=8 und Slack-KO n=9; \*  $p < 0,05$ ; # steht für die Zunahme ( $p < 0,05$ ) und \$ für die Abnahme ( $p < 0,05$ ) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

Angesichts der Ergebnisse der basalen mRNA-Expressionsanalyse der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren wurde im Folgenden nur die Änderung der mRNA-Level von BDNF, NT-3, TrkB und TrkC in Abhängigkeit der NMDA-Exzitotoxizität untersucht. Aufgrund der fehlenden Genexpression unter basalen Bedingungen wurden NGF und TrkA nicht weiter berücksichtigt. Die mRNA-Expressionsdaten der CGC-Kulturen beider Genotypen zeigen für BDNF nahezu eine Verdopplung der Genexpression nach 1 h Stimulation mit NMDA (WT FC:  $1,9484 \pm 0,2806$ ; Slack-KO FC:  $1,8467 \pm 0,2137$ ). Besonders hervorzuheben ist die Zunahme der BDNF-mRNA-Expression nach 6 h NMDA-Inkubation. In WT CGCs können um das 6-fach höhere BDNF-mRNA-Expressionslevel nachgewiesen werden als unter Basalbedingungen (WT FC:  $5,7806 \pm 0,5731$ ). Dieser Anstieg fällt in den Slack-KO Kulturen



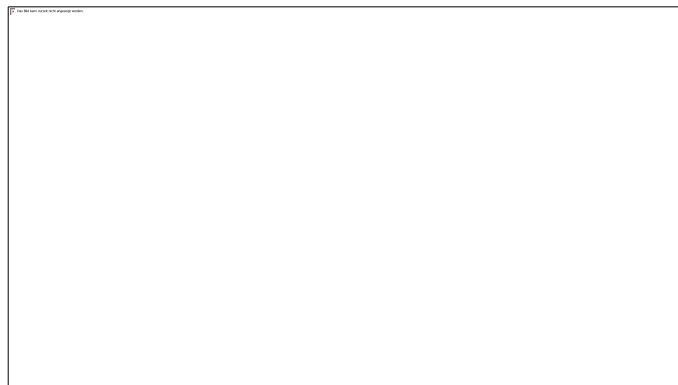
noch 5-fach und damit nur geringfügig schwächer aus (Slack-KO FC:  $4,7697 \pm 0,4724$ ). Nach 24 h NMDA-Inkubation kann eine leichte Abnahme der BDNF-mRNA-Expressionslevel im Vergleich zur Expression nach 6 h exzitotoxischer Stimulation festgestellt werden. Jedoch sind die BDNF-mRNA-Level noch 3-fach höher als unter Basalbedingungen (WT FC:  $3,2939 \pm 0,2929$ ; Slack-KO FC:  $3,1608 \pm 0,4434$ ). Der Anstieg der BDNF-mRNA-Expression nach 1 h, 6 h und 24 h NMDA-induzierter Exzitotoxizität ist im Vergleich zu den Basalniveaus sowohl für WT als auch Slack-KO CGCs signifikant. Es ergeben sich jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

Neben dem Anstieg der BDNF-mRNA-Level kann für WT und Slack-KO CGC-Kulturen eine signifikante Zunahme der NT-3-mRNA-Expressionslevel nach 6 h (WT FC:  $1,9171 \pm 0,0988$ ; Slack-KO FC:  $1,6876 \pm 0,1370$ ) und 24 h (WT FC:  $1,7955 \pm 0,1881$ ; Slack-KO FC:  $1,7467 \pm 0,1522$ ) NMDA-Inkubation nachgewiesen werden. Erneut hat die Slack-Ablation per se keinen Einfluss auf die NT-3-mRNA-Expressionslevel.

Des Weiteren kann in WT CGCs mit andauernder NMDA-Inkubationszeit die Zunahme der mRNA-Expressionslevel der BDNF- bzw. NT-3-affinen Rezeptoren TrkB und TrkC festgestellt werden. So führt die einstündige Stimulation mit NMDA zu einer 3-fachen (TrkB WT FC:  $3,0056 \pm 0,5146$  und TrkC WT FC:  $2,8896 \pm 0,3895$ ) und die Stimulation für 6 h zu einer 5-fachen Zunahme der mRNA-Rezeptorlevel (TrkB WT FC:  $5,5140 \pm 1,4591$  und TrkC WT FC:  $4,8231 \pm 1,2994$ ). Ähnlich wie bereits für BDNF beobachtet, kommt es nachfolgend zu einer leichten Abnahme der Expressionslevel. So sind diese im Vergleich zu den Basalwerten nach 24 h NMDA nicht mehr signifikant erhöht (TrkB WT FC:  $2,1123 \pm 0,4699$  und TrkC WT FC:  $1,5778 \pm 0,3554$ ). Interessanterweise hat die NMDA-Inkubation in den Slack-KO CGC-Kulturen keinen Einfluss auf die mRNA-Expressionslevel von TrkB und TrkC. So kann nach einer NMDA-Inkubationszeit von 1 h (TrkB Slack-KO FC:  $1,4498 \pm 0,1150$  und TrkC Slack-KO FC:  $1,4567 \pm 0,1059$ ) bzw. von 6 h (TrkB Slack-KO FC:  $1,6507 \pm 0,2683$  und TrkC Slack-KO FC:  $1,5558 \pm 0,2731$ ) nur eine 1,5-fache Zunahme der Genexpression dieser beiden Rezeptoren festgestellt werden. Nach 24 h sind die bestimmten mRNA-Level sogar geringer als unter Basalbedingungen (TrkB Slack-KO FC:  $0,8147 \pm 0,0790$  und TrkC Slack-KO FC:  $0,8508 \pm 0,1357$ ). Die genotypspezifischen Expressionsunterschiede der TrkB-Rezeptor-mRNA sind für alle drei untersuchten Zeitpunkte signifikant. Darüber hinaus ist der Unterschied der TrkC-mRNA Expression zwischen WT und Slack-KO CGCs nach 1 h und 6 h NMDA-Inkubation ebenfalls signifikant.

#### 4.3.9 Einfluss der BDNF-Präinkubation auf das Zellüberleben im Rahmen exzitotoxischer NMDA-Untersuchungen

Die Expressionsanalyse deutet auf eine Slack-abhängige Regulation der Tyrosinkinase-Rezeptoren hin. Insbesondere die im Vergleich zu WT CGCs reduzierte TrkB-mRNA-Expression in NMDA behandelten Slack-KO Kulturen (siehe Abbildung 4.16 E) impliziert, dass der BDNF-TrkB-Signalweg an den Slack-abhängigen neuroprotektiven Effekten in WT Neuronen beteiligt sein könnte. Zudem kommt es in WT und Slack-KO CGC-Kulturen nach NMDA-Inkubation zu einer Hochregulierung von BDNF (siehe Abbildung 4.16 B). Nachweislich hat der BDNF-TrkB-Signalweg eine neuroprotektive Funktion (Han und Holtzman 2000, Hashimoto et al. 2002, Almeida et al. 2005). Um den Zusammenhang zwischen BDNF-TrkB und dem Slackstatus bei NMDA-induzierter Exzitotoxizität genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden Co-Stimulationsexperimente durchgeführt. Konkret wurden die WT und Slack-KO CGC-Kulturen einerseits vor Beginn der NMDA-Applikation mit BDNF präinkubiert oder andererseits eine BDNF und NMDA Co-Stimulation vorgenommen (Material und Versuchsdurchführung siehe 2.2.5 und 3.6.1). Neuroprotektive Effekte nach BDNF-Präinkubation wurden in verschiedenen Exzitotoxizitätsstudien mit kultivierten cerebellären (Lindholm et al. 1993) sowie hippocampalen Neuronen (Almeida et al. 2005) und im *in vivo middle cerebral artery occlusion* (MCAO)-Modell nach Verschluss der mittleren Gehirnschlagader beobachtet (Lindholm et al. 1993, Yamashita et al. 1997, Almeida et al. 2005).



#### Abbildung 4.17: Einfluss von BDNF auf das Zellüberleben nach NMDA-Exzitotoxizität

Quantifizierung der relativen LDH-Aktivität nach Präinkubation mit BDNF für 14 h und anschließender NMDA-Stimulation, bzw. nach direkter Co-Applikation von BDNF mit NMDA. Als Vergleichskontrolle dient die NMDA-Inkubation ohne Co-Applikation von BDNF. Es ergeben sich keine genotypspezifischen Unterschiede in den relativen LDH-Aktivitäten von WT und Slack-KO CGC-Kulturen unter Basalbedingungen bzw. nach BDNF-Applikation (unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation). Nach Stimulation mit 300  $\mu$ M NMDA  $\pm$  50 ng/ $\mu$ l BDNF sind die relativen LDH-Aktivitäten im Vergleich zur Kontrolle in beiden Genotypen signifikant erhöht. Slack-KO CGCs zeigen nach Stimulation mit NMDA bzw. der Co-Applikation von BDNF und NMDA signifikante höhere LDH-Aktivitäten als WT CGCs. Die genotypspezifischen Unterschiede werden durch die BDNF-Präinkubation aufgehoben. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=7 und Slack-KO n=5; \* p < 0,05; # steht für p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle).

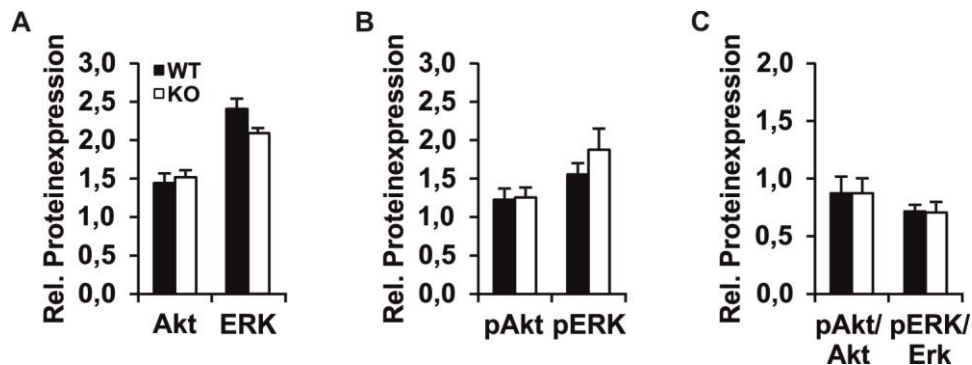
Abbildung 4.17 zeigt die Quantifizierung der relativen LDH-Aktivität infolge unterschiedlicher Behandlung der WT/Slack-KO CGC-Kulturen. Dabei wurde einerseits der Slack-abhängig Einfluss einer BDNF-Präinkubation und andererseits die Co-Applikation von BDNF auf die NMDA-induzierte exzitotoxische neuronale Schädigung untersucht (Versuchsdurchführung siehe 3.6.1). Für die Präinkubationsversuche wurde den Kulturen 14 h vor dem eigentlichen Versuchsbeginn BDNF zugesetzt. Zudem wurden Kontrollkulturen ohne NMDA- bzw. ohne BDNF- und NMDA-Stimulation mitgeführt. Analog zu den in den Abschnitten 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3 dargestellten Exzitotoxizitätsstudien ist in WT und Slack-KO Kontrollkulturen, welche mit Erhaltungsmedium ohne Zusatz von NMDA  $\pm$  BDNF inkubiert wurden, nur eine geringe LDH-Freisetzung festzustellen (WT:  $3,7798 \pm 0,3714$ ; Slack-KO:  $5,0616 \pm 0,5634$ ). Wie im Methodenteil 3.6.1 beschrieben erfolgte die BDNF-Präinkubation der Zellen aus technischen Gründen mit 400  $\mu$ l BDNF-Lösung statt, wie bei den restlichen Versuchen üblich, in 600  $\mu$ l Medium/Lösung. Aufgrund dessen wurde eine zweite Kontrolle (Erhaltungsmedium) mit 400  $\mu$ l Medium mitgeführt. Dadurch soll gezeigt werden, dass die Inkubation in einem geringeren Volumen während der Präinkubationsphase keine Auswirkung auf das Wachstum und die Vitalität der Zellen hat. Entsprechend den Erwartungen bestanden zwischen den beiden Vitalkontrollen (400  $\mu$ l und 600  $\mu$ l Medium) keine Unterschiede im Zellüberleben (WT:  $5,2208 \pm 0,3381$ ; Slack-KO:  $5,2207 \pm 0,5093$ ) (siehe Abbildung 4.17). Darüber hinaus haben auch die versuchsbedingten Mediumwechsel und die dadurch hervorgerufenen mechanischen und physikochemischen Beanspruchungen keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität. In Abwesenheit von NMDA hat BDNF keinen Einfluss auf die basale LDH-Aktivität (14 h Präinkubation: WT:  $4,9360 \pm 0,4688$ ; Slack-KO:  $5,7726 \pm 1,2469$  und Co-Applikation BDNF: WT:  $4,1490 \pm 0,5394$ ; Slack-KO:  $7,1459 \pm 1,4529$ ). Wie bereits in dem vorausgegangenen NMDA-Exzitotoxizitätsexperiment aufgezeigt wurde (siehe 4.3.3), kommt es auch hier (siehe Abbildung 4.17) infolge der Inkubation der CGC-Kulturen mit NMDA zu einer signifikant größeren LDH-Freisetzung als unter Kontrollbedingungen (WT:  $17,7490 \pm 1,2652$ ; Slack-KO:  $22,4283 \pm 1,1960$ ). Auch der bereits in Abschnitt 4.3.3 beschriebene Einfluss der Slack-Ablation auf das Zellüberleben kann bestätigt werden. Entsprechend führt die NMDA-Inkubation in den Slack-KO CGCs zu einer signifikant stärkeren Freisetzung von LDH und somit zu einem größeren Ausmaß neuronaler Schädigung als in den WT Kulturen ( $p = 0,0396$ ). Die Co-Applikation von BDNF und NMDA hat keinen Einfluss auf das Überleben der CGC-Kulturen (WT:  $17,8593 \pm 1,2350$ ; Slack-KO:  $22,8127 \pm 1,0567$ ), der signifikante Unterschied im Zellüberleben zwischen WT und Slack-KO CGCs bleibt bestehen ( $p = 0,0247$ ). Interessanterweise zeigt die BDNF Präinkubation einen genotypunabhängigen Effekt auf die NMDA-induzierte LDH-Freisetzung. In Kulturen beider Genotypen ist die gemessene LDH-Aktivität nach BDNF-Präinkubation geringer als in den NMDA-Positivkontrollgruppen. Das Ausmaß der Reduktion der relativen

LDH-Aktivität ist in den Slack-KO CGCs größer als im WT ( $\Delta$ WT  $1,93 \pm 0,57$ ;  $\Delta$ Slack-KO:  $4,87 \pm 1,45$ ;  $p = 0,0851$ ), wodurch der signifikante Unterschied zwischen den LDH-Aktivitäten beider Genotypen verloren geht (WT:  $15,8162 \pm 1,5346$ ; Slack-KO:  $17,5546 \pm 1,9412$ ). Eine Erklärung für den geringeren Effekt im WT könnte sein, dass infolge der NMDA-Stimulation neben TrkB auch der Ligand BDNF hochreguliert wird. Durch diese Co-Regulation (siehe Abbildung 4.16) könnte der Signalweg in WT CGCs bereits endogen maximal stimuliert sein, weshalb durch die exogene BDNF-Zufuhr keine weitere Steigerung erzielt werden kann. Dieser Befund impliziert, dass durch die endogene BDNF-getriggerte Aktivierung von TrkB in WT CGCs die nachgeschalteten protektiven Signalwege stärker aktiviert werden, was letztlich zu der geringeren Vulnerabilität der WT Neurone bei NMDA-Exzitotoxizität führt.

#### **4.3.10 Einfluss von Slack auf die BDNF-induzierten Signalwege Akt/ERK**

BDNF sowie andere Neurotrophine können durch die Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie beispielsweise der Bindung an den TrkB-Rezeptor, PI3K- und MAPK-Signalwege aktivieren. Dadurch kommt es u. a. zur Phosphorylierung von Akt bzw. ERK. Nachfolgendes Effektorprotein dieser beiden Kinasen ist u. a. CREB (siehe 1.4). Die Phosphorylierung von CREB führt zur Aktivierung von pCREB, das als Transkriptionsfaktor die Bildung antiapoptotischer Gene beeinflussen kann. Die durch NMDA-Exzitotoxizität induzierte Hochregulation von BDNF- und NT-3-mRNA sowie die in WT CGCs spezifisch erhöhten mRNA-Expressionslevel von TrkB und TrkC (siehe Abschnitt 4.3.8) lassen vermuten, dass Akt, ERK und/oder CREB als Komponenten möglicher *Downstream*-Signalwege TrkB-/TrkC-abhängig in CGCs aktiviert werden. Um diese interessante Fragestellung zu klären, wurden WB-Analysen von WT bzw. Slack-KO CGC-Kulturen nach exzitotoxischer Stimulation durchgeführt. Dazu wurden die CGC-Kulturen vor der Proteinisolation für 1 - 6 h mit 300  $\mu$ M NMDA-Lösung inkubiert (Material und Versuchsdurchführung siehe 2.2.7 und 3.8). Als Kontrolle diente eine nicht mit NMDA behandelte Probe. Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Inkubation mit (p)Akt-/ (p)ERK- und (p)CREB-spezifischen Antikörpern sowie die nachfolgende Quantifizierung der Proteinmenge (siehe 3.8).

Die Quantifizierung der basalen Proteinexpression von (p)Akt und (p)ERK sowie das Verhältnis von pAkt/Akt und pERK/ERK sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

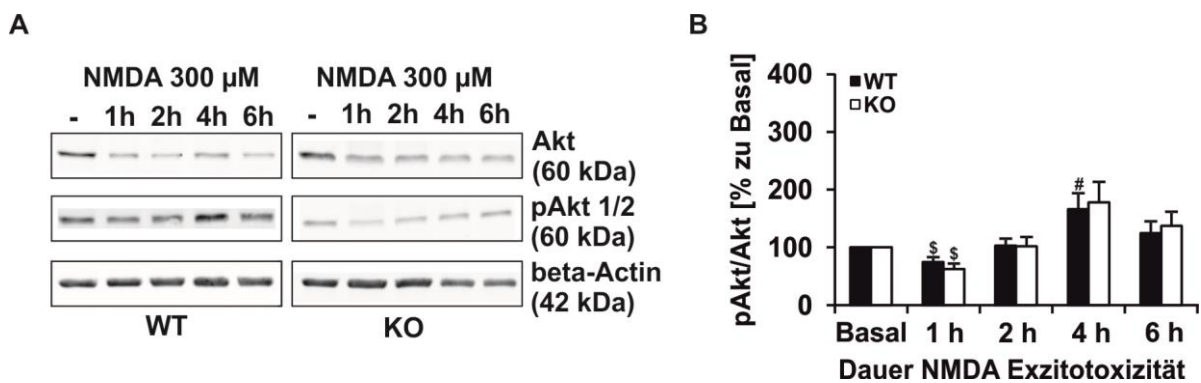


**Abbildung 4.18: Relative Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK unter Basalbedingungen**

Quantifizierung der Proteinexpression von **A** Akt bzw. ERK und **B** pAkt bzw. pERK jeweils bezogen auf die  $\beta$ -Aktin-Proteinexpression. **C** Verhältnis aus den relativen Proteinexpressionsleveln von pAkt und Akt bzw. pERK und ERK. Es ergeben sich keine genotypspezifischen Unterschiede in den dargestellten Expressionleveln unter Basalbedingungen. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=7-8 und Slack-KO n=6-8).

Im Rahmen der Western Blot-Analyse ergaben sich weder für Akt (WT:  $1,44 \pm 0,13$ ; Slack-KO:  $1,52 \pm 0,09$ ) bzw. pAkt (WT:  $1,23 \pm 0,14$ ; Slack-KO:  $1,25 \pm 0,13$ ) noch für ERK (WT:  $2,40 \pm 0,13$ ; Slack-KO:  $2,0 \pm 0,06$ ) bzw. pERK (WT:  $1,55 \pm 0,14$ ; Slack-KO:  $1,87 \pm 0,27$ ) Unterschiede in den relativen Proteinexpressionsleveln unter Basalbedingungen (Erhaltungsmedium). Auch für die berechneten Ratios von pAkt/Akt (WT:  $0,87 \pm 0,10$ ; Slack-KO:  $0,87 \pm 0,13$ ) bzw. pERK/ERK (WT:  $0,71 \pm 0,06$ ; Slack-KO:  $0,70 \pm 0,09$ ) sind basal keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp zu beobachten.

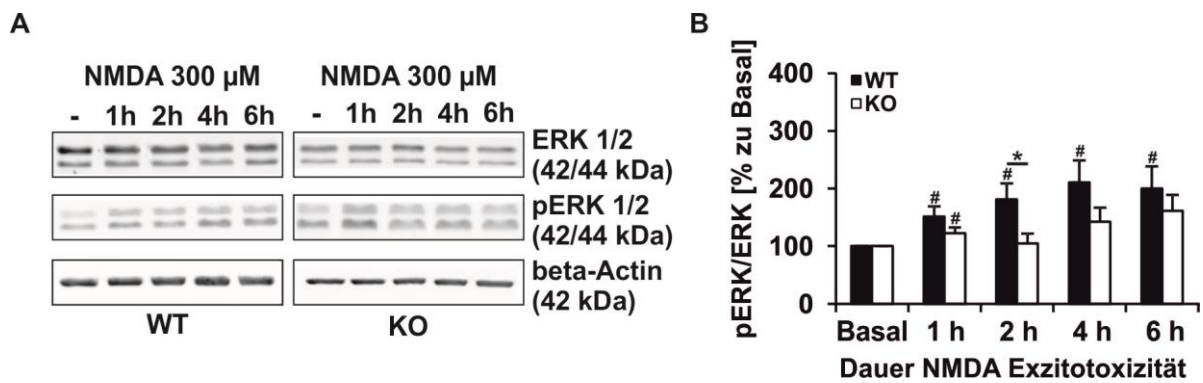
Neben der basalen Proteinexpression wurde auch die Expression von (p)Akt bzw. (p)ERK im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität bestimmt. In Abbildung 4.19 und Abbildung 4.20 sind repräsentative WBs für WT und Slack-KO sowie das Verhältnis aus der Quantifizierung der Proteinbanden von pAkt/Akt und pERK/ERK abgebildet.



#### Abbildung 4.19: Aktivierung von Akt im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität

**A** Repräsentative Western Blots der Akt bzw. pAkt-Expressionslevel von WT und Slack-KO CGCs im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität. **B** Verhältnis der quantifizierten relativen Proteinexpressionslevel von pAkt zu Akt. Im Verlauf der NMDA-Stimulation kommt es in WT und Slack-KO CGCs zunächst zur signifikanten Reduktion des Verhältnisses von pAkt/Akt. Im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität nimmt dieses jedoch zu und erreicht nach 4 h ein Maximum. Dabei können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT  $n=6-7$  und Slack-KO  $n=5-8$ ; # steht für die Zunahme ( $p < 0,05$ ) und \$ für die Abnahme ( $p < 0,05$ ) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

Nach der einstündigen Inkubation der CGC-Kulturen mit NMDA kommt es sowohl in WT als auch Slack-KO Kulturen zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses von pAkt zu Akt. Die Ratio aus pAkt/Akt entspricht nur noch ca. 60 - 70 % des entsprechenden Verhältnisses unter Basalbedingungen (WT:  $74,74 \pm 8,12$  % zu Basal; Slack-KO:  $62,23 \pm 9,45$  % zu Basal). Im weiteren Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität kommt es dann zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Akt. Dabei kann für das Verhältnis von pAkt zu Akt nach 4 h NMDA-Stimulation genotypunabhängig ein Maximum beobachtet werden (WT:  $166,52 \pm 11,89$ ; Slack-KO:  $177,65 \pm 35,80$ ). Für WT CGCs unterscheidet sich dieses sogar signifikant von dem pAkt/Akt Verhältnis unter Basalbedingungen. Da die relativen Proteinexpressionslevel von Akt jedoch über den gesamten Verlauf nur etwa 55 - 70 % der basalen Proteinmenge betragen (siehe Anhang Abbildung 8.2 A) basiert dieser Unterschied auf einer NMDA-getriggerten gesteigerten Phosphorylierung von Akt (siehe Anhang Abbildung 8.2 C) im Verlauf der Versuchsdauer. Die Daten der Proteinexpressionsanalysen von (p)Akt zeigen jedoch keine genotypabhängigen Unterschiede in der Aktivierung dieses Signalwegs. Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit eine gesteigerte Aktivierung der MAPK/ERK-Signalkaskade in WT CGCs beobachtet werden (siehe Abbildung 4.20).

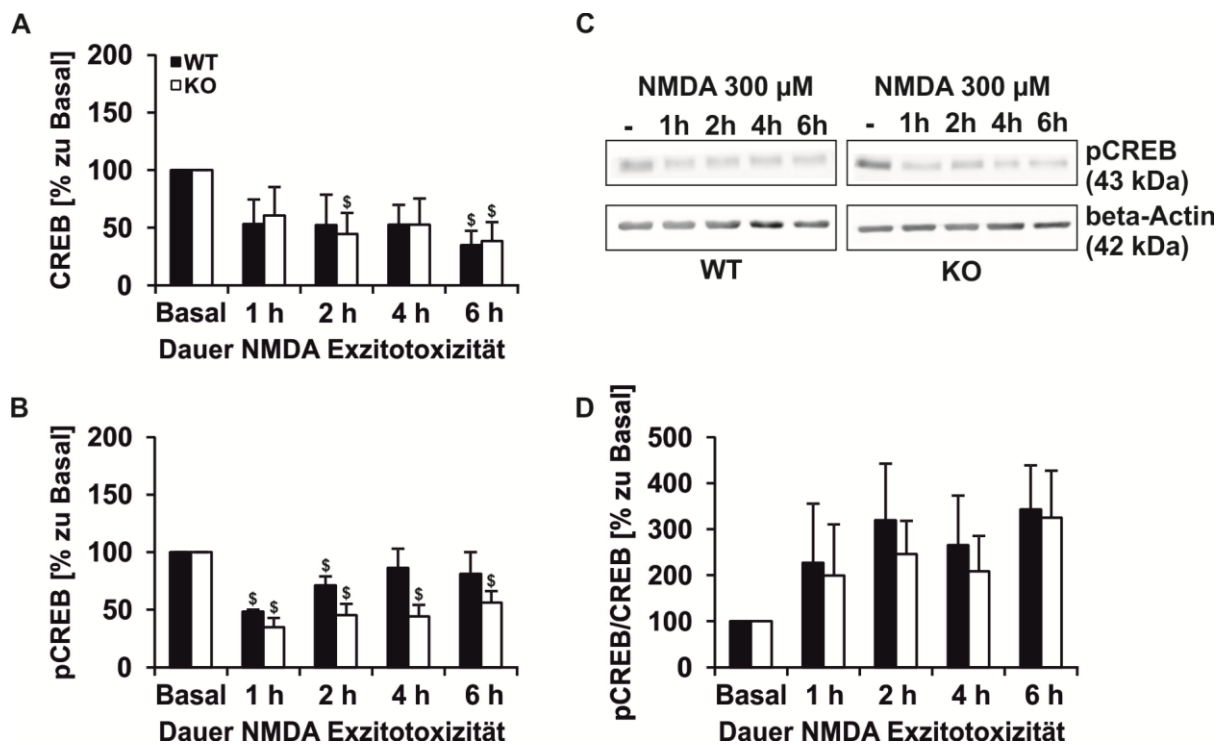


**Abbildung 4.20: Aktivierung von ERK im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität**

**A** Repräsentative Western Blots der ERK bzw. pERK-Expressionslevel von WT und Slack-KO CGCs im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität. **B** Verhältnis der quantifizierten relativen Proteinexpressionslevel von pERK zu ERK. Im Verlauf der NMDA-Stimulation kommt es selektiv im WT zu einer signifikanten Zunahme des Verhältnisses von pERK/ERK. In Slack-KO CGCs ist eine z. T. signifikant geringere Zunahme der pERK/ERK Verhältnisse nachweisbar. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=6-7 und Slack-KO n=5-8; \* p < 0,05; # steht für die Zunahme (p < 0,05) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

Wie aus Abbildung 4.20 hervorgeht kommt es infolge der Inkubation der CGC-Kulturen mit NMDA-Lösung (Material und Versuchsdurchführung siehe 2.2.7 und 3.8) selektiv in WT CGCs zur Induktion der ERK-Phosphorylierung. In Slack-KO CGC-Kulturen hingegen nimmt das Verhältnis von pERK/ERK bei Exzitotoxizität nur geringfügig zu. Im Verlauf der NMDA-abhängigen Proteinexpressionsanalyse kann für WT CGC-Kulturen bereits nach 1 h eine, auch zu späteren Zeitpunkten jeweils signifikante Zunahme des Verhältnisses von pERK zu ERK (1 h:  $151,23 \pm 17,63$ ; 2 h:  $189,83 \pm 30,59$ ; 4 h:  $210,43 \pm 38,68$ ; 6 h:  $200,12 \pm 37,87$ ) im Vergleich zur basalen Expression nachgewiesen werden. In Slack-KO Kulturen hingegen ist die Zunahme der Ratio von pERK/ERK im Vergleich zum Verhältnis unter Basalbedingungen nur nach 1 h NMDA-Stimulation signifikant ( $122,54 \pm 10,12$ ). Über die gesamte Versuchsdauer zeigen WT CGC-Kulturen im Vergleich zu Slack-KO CGCs tendenziell höhere pERK/ERK Verhältnisse. Diese Unterschiede erreichen jedoch nur nach 2 h NMDA-Stimulation das Signifikanzniveau.

Zusammen mit den mRNA-Expressionsdaten (siehe 4.3.8) könnten die hier aufgezeigten Befunde darauf hindeuten, dass es infolge der Slack-Kanalaktivität zu einem vermehrten BDNF-TrkB-Signalling und dadurch bedingt zu einer gesteigerten Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs kommt. Dies wiederum könnte nachfolgend zur Induktion der CREB-Phosphorylierung führen. Aufgrund dessen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die relativen Proteinexpressionslevel von (p)CREB sowie das Verhältnis von pCREB/CREB bestimmt. In Abbildung 4.21 sind repräsentative Western Blots sowie die Quantifizierung der pCREB/CREB Ratio abgebildet.



**Abbildung 4.21: Phosphorylierung von CREB im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität**

Quantifizierung der relativen Expressionslevel von **A** CREB und **B** pCREB bezogen auf die basale Expression. **C** Repräsentative Western Blots pCREB-Expressionslevel von WT und Slack-KO CGCs im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität. **B** Verhältnis der quantifizierten relativen Proteinexpressionslevel von pCREB zu CREB. Im Verlauf der NMDA-Stimulation kommt zu einer Zunahme des Verhältnisses von pCREB/CREB. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=4 und Slack-KO n=4).

Im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität kommt es zur Abnahme der relativen CREB-Expressionslevel im Vergleich zur basalen Proteinexpression (siehe Abbildung 4.21 A). Dabei wird sowohl in WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen eine anhaltende Reduktion der Expressionslevel um etwa 50 - 60 % beobachtet. Diese Unterschiede in der CREB-Expression sind für WT Kulturen nach 6 h ( $34,73 \pm 12,52$ ) und für Slack-KO CGCs nach 2 h und 6 h (2 h:  $44,62 \pm 18,29$ ; 6 h:  $38,53 \pm 16,20$ ) signifikant. Darüber hinaus führt die NMDA-Inkubation der Kulturen beider Genotypen initial zu einer Abnahme der pCREB-Proteinexpressionslevel. Diese Reduktion der Proteinlevel ist für WT CGCs nach 1 h und nach 2 h (1 h:  $48,55 \pm 1,46$ ; 2 h:  $71,08 \pm 7,89$ ) NMDA-Exzitotoxizität signifikant. In Slack-KO CGC-Kulturen hingegen bleiben die pCREB-Expressionslevel über den gesamten Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität auf einem, im Vergleich zur Expression unter Basalbedingungen, signifikant niedrigeren Niveau (1 h:  $34,98 \pm 7,88$ ; 2 h:  $45,47 \pm 9,59$ ; 4 h:  $44,2 \pm 10,20$ , 6 h:  $56,26 \pm 10,03$ ). Das Verhältnis der Proteinexpressionslevel von pCREB und CREB ist während der gesamten Dauer der NMDA-Stimulation größer als unter basalen Kultivierungsbedingungen. Aufgrund der großen Streuung der Einzeldaten ergeben sich jedoch keine Signifikanzen.



## 5 Diskussion

Akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen gehören zu den führenden Ursachen für Tod und Behinderung weltweit. Damit stellen sie auch ein großes gesundheitsökonomisches Problem dar. Prognosen des Nationalen Instituts für Gesundheit besagen, dass aufgrund der zunehmenden Alterserwartung der Bevölkerung die Behandlungskosten für die beiden häufigsten neurologischen Erkrankungen, die cerebrale Ischämie (Schlaganfall) und Alzheimer Krankheit, bis zum Ende dieses Jahrhunderts das komplette Bruttonationaleinkommen verbrauchen würden (Lipton 2004). Zu den akuten neurodegenerativen Erkrankungen zählen hypoxische bzw. ischämische Zustände des Gehirns, Epilepsie und chronische Erkrankungen wie Chorea Huntington, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Multiple Sklerose (MS) sowie die HIV-assoziierte Demenz. Alle diese Erkrankungen haben zwar primär unterschiedliche Ursachen, teilen sich jedoch letztlich einen gemeinsamen Mechanismus der exzitotoxischen Neuronenschädigung. Diese Form der Neuronenschädigung wird durch die Überstimulation glutamaterger Rezeptoren, allen voran der NMDA-Rezeptoren, sowie dem nachfolgenden exzessiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die iGluRs und assoziierte spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle verursacht (Medicine 2011). So sind Störungen im exzitatorischen glutamatergen Neurotransmittersystem (siehe 1.4) Teil der pathologischen Grundlage für oben genannte neurologische Erkrankungen. Die physiologische NMDA-Rezeptoraktivität ist jedoch unerlässlich für die reguläre Funktion der Neurone. So ist Glutamat als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter im ZNS an der synaptischen Plastizität, dem Dendritenwachstum und Lernprozessen beteiligt (Fonnum 1984, Constantine-Paton 1990, McDonald und Johnston 1990, Bliss und Collingridge 1993, Meldrum 2000). Potentielle neuroprotektive Therapieansätze zur Behandlung cerebraler Ischämie sowie progredienter neurodegenerativer Erkrankungen durch die nicht-selektive Blockade von NMDA-Rezeptoren und der dadurch bedingten Unterdrückung der gesamten NMDA-Rezeptoraktivität führen z. T. zu schwerwiegenden nicht tolerierbaren Nebenwirkungen. Aus diesem Grund sowie unzureichender Wirksamkeit sind einige NMDA-Antagonisten im fortgeschrittenen Verlauf klinischer Studien durchgefallen (Davis et al. 2000, Ikonomidou und Turski 2002, Albeni et al. 2004, Lipton 2004, Muir 2006). Bislang werden nur wenige NMDA-Rezeptorantagonisten therapeutisch genutzt. Dazu zählt das für die Behandlung der Alzheimer Krankheit zugelassene Memantin, welches selektiv in die Pore geöffneter NMDA-Rezeptoren bindet. Dadurch inhibiert Memantin selektiv die exzessiv stimulierten Rezeptoren, ohne die physiologische Aktivität anderer NMDA-Rezeptoren zu stören (Lipton 2004, Sonkusare et al. 2005). Derzeit wird intensiv an einer Arzneistoffklasse von Memantin-Derivaten der zweiten Generation geforscht. Diese sollen eine höhere Selektivität gegenüber spezifischen NMDA-Rezeptoruntereinheiten aufweisen und dadurch zu noch weniger Nebenwirkungen führen

(Lipton 2004). Die Blockade der NMDA-Rezeptoren führt primär zur Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$ , welche sich neuroprotektiv auswirkt. Eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Reduktion kann prinzipiell auch durch die Blockade spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle erreicht werden. Dies kann unter anderem durch die Stabilisierung des Membranpotentials erreicht werden. Bekannterweise tragen  $K^+$ -Kanäle essentiell zur Repolarisation sowie Hyperpolarisation der Zellmembran bei und können dadurch die exzessive Zellerregbarkeit verhindern oder umkehren. Sie liefern somit einen fundamentalen Beitrag zur Kontrolle der zellulären Aktivität. Aufgrund ihrer Membranpotential-stabilisierenden Eigenschaften, die der Übererregbarkeit der Zelle entgegensteuern können, sind  $K^+$ -Kanäle als potentielle neuroprotektive *Targets* immer mehr in den Fokus der biomedizinischen Forschung auf den Gebieten der Neurodegeneration/-protektion, Neurogenese und neuronaler Regeneration gerückt (Lawson und McKay 2006, Dolga et al. 2011, Dolga und Culmsee 2012). Spezifische  $K^+$ -Kanalmodulatoren könnten beispielsweise die Aktivität der Kanäle steigern und dadurch die Hyperpolarisation verstärken bzw. verlängern und so beispielsweise der Überladung der Zelle mit  $Ca^{2+}$ -Ionen entgegenwirken (Susan et al. 2007). So wurde bereits eine neuroprotektive Wirkung für Wirkstoffe, die die Aktivierung von spannungsabhängigen KCNQ-Kanälen (KCNQ2, KCNQ2/3 und KCNQ5) (Tatulian et al. 2001),  $K_{ATP}$ -Kanälen (Ortega et al. 2012) sowie SK-Kanälen (Grunnet et al. 2001, Allen et al. 2011, Dolga und Culmsee 2012) bzw. BK-Kanälen (Gribkoff et al. 2001, Wu 2003, Bentzen et al. 2014) fördern, als mögliche Therapieansätze zur Behandlung chronischer sowie akuter neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert. Teilweise wurden  $K^+$ -Kanalmodulatoren bereits am Menschen angewendet. Die beiden KCNQ-Aktivatoren Retigabin und Flupirtin wurden beispielsweise aufgrund ihrer krampflösenden sowie z. T. analgetischen Wirkung bei Epilepsien als Zusatztherapie fokaler Krampfanfälle bzw. zur akuten Schmerztherapie eingesetzt. Aufgrund des geringen Zusatznutzens gegenüber bisherigen Medikamenten (Retigabin) bzw. schwerwiegenden Nebenwirkungen (Flupirtin) wurden sie jedoch 2017 bzw. 2018 wieder vom Markt genommen (Lawson und McKay 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse liefern Evidenz dafür, dass der  $Na^+$ -aktivierte  $K^+$ -Kanal Slack als Angriffspunkt für eine neuroprotektive Therapie im Rahmen exzitotoxischer Schädigung dienen könnte. Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Kontext der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse diskutiert werden.

## 5.1 Diskussion der *in vivo* generierten Daten

### 5.1.1 Expression von Slack im Striatum

Das Expressionsmuster des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack wurde bereits mehrfach mittels *in-situ*-Hybridisierung sowie IHC-Färbung beschrieben (Joiner et al. 1998, Bhattacharjee et al. 2002, Bhattacharjee et al. 2003, Brown et al. 2008, Rizzi et al. 2016). Mehrere dieser Arbeiten zeigen eine Expression des Kanals in striatalen Neuronen. So konnten Berg et al. mittels *in-situ*-Hybridisierung Slo2.2-Kanäle in den mittelgroßen Projektionsneuronen des Striatums nachweisen. Diese speziellen GABA-ergen Neurone machen etwa 95 % der humanen Neuronenpopulation im Striatum aus. Auch konnten sie Na<sup>+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Ströme im Striatum messen (Berg et al. 2007). Weiterhin demonstrieren Rizzi et al. u. a. die Expression des Kanals in striatalen Gehirnregionen (Rizzi et al. 2016). Ein großer Nachteil dieser Studien ist allerdings das Fehlen einer geeigneten *Knockout*-Kontrolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend erstmals parallel zum Nachweis der Expression des Slack-Kanals im Striatum die Spezifität des verwendeten anti-Slack Antikörpers von Neuromab durch Parallelfärbungen von Slack-KO Geweben demonstriert. Der verwendete Antikörper ist gegen den C-Terminus des Kanals gerichtet und erkennt dementsprechend beide Slack-Isoformen. Die in Abbildung 4.1 dargestellten IHC- bzw. IF-Färbungen (siehe 4.1.1) bestätigen einerseits die striatale Slack-Expression und andererseits die Spezifität des verwendeten anti-Slack Primärantikörpers. So zeigen die Gehirnschnitte der WT Tiere nach Inkubation mit dem anti-Slack Antikörper eine spezifische Immunreaktivität, welche in den Slack-KO Gewebeschnitten nicht vorliegt.

### 5.1.2 Intrastriatale NMDA-Injektion zur Untersuchung der Slack-Neuroprotektion *in vivo*

Aufgrund der postulierten Aktivierbarkeit des hauptsächlich neuronal exprimierten Slack-Kanals durch Na<sup>+</sup>-Ionen die z. B. über spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Ionenkanäle und ionotrope Rezeptoren (AMPA- bzw. NMDA-Rezeptoren) sowie spannungsabhängige nichtselektive Ionenkanäle in die Zelle gelangen (Joiner et al. 1998, Kaczmarek 2013, Rizzi et al. 2016), ist eine Beteiligung von Slack im Rahmen exzitotoxischer Prozesse denkbar. Zudem deuten einige Studien an, dass Slack-Kanäle über einen langanhaltenden K<sup>+</sup>-Ionen Ausstrom zur langsamen Nachhyperpolarisation und somit zur Regulation neuronaler Aktionspotentialmuster beitragen können (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005, Kaczmarek 2013).

Um den Einfluss der Ablation von Slack auf den Verlauf der exzitotoxischen Neurotoxizität *in vivo* zu untersuchen, wurden WT bzw. Slack-KO Wurfgeschwister einer striatalen Mikroinjektion von NMDA unterzogen (siehe 4.1.2). Dies stellt eine bewährte Methode zur

Induktion von Exzitotoxizität dar, welche die vergleichende Analyse des Ausmaßes der neuronalen Schädigung *in vivo* ermöglicht (Ayata et al. 1997, Ali et al. 2000, Mandir et al. 2000, Liao et al. 2010). Die Untersuchung der exzitotoxischen Neurodegeneration *in vivo* bietet gegenüber den *in vitro* Exzitotoxizitätsstudien den Vorteil, dass die Auswirkungen der NMDA-Injektion im Kontext des physiologischen Umfelds der Neurone betrachtet werden können. Dadurch wird auch das Zusammenspiel zwischen den Slack exprimierenden GABA-ergen Interneuronen und anderen Neuronengruppen im Striatum berücksichtigt. Auch wird die Zirkulation neuroprotektiver sowie neurotoxischer Substrate, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, inflammatorischer Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$ ), NO und Neuropeptiden, welche u. a. aus aktivierten Astrozyten und Mikroglia freigesetzt werden, gewährleistet (Perez-Capote et al. 2004).

Die gewählten Versuchsparameter (siehe 3.4), wie beispielsweise die Koordinaten der Injektionsstelle, das injizierte Volumen, die Applikationsdauer sowie die Methode zur Quantifizierung der neuronalen Schädigung, wurden entsprechend den in der Literatur beschriebenen Angaben gewählt (Ayata et al. 1997, Mandir et al. 2000). Dies ermöglicht die Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in den wissenschaftlichen Gesamtkontext. Bei der Versuchsplanung wurden alle Parameter berücksichtigt, die das Ausmaß der exzitotoxischen Schädigung *in vivo* beeinflussen können (McDonald et al. 1988, Ayata et al. 1997, Massieu und Tapia 1997, Roof und Hall 2000, Zhang et al. 2008). So wird in der Literatur beispielsweise mehrfach eine altersabhängig veränderte Dichte an Glutamattransportern (Massieu und Tapia 1997) und NMDA-Rezeptoren (McDonald et al. 1988) sowie ein neuroprotektiver Effekt der weiblichen Geschlechtshormone Estrogen und Progesteron (Roof und Hall 2000, Zhang et al. 2008) beschrieben. Dementsprechend wurden ausschließlich männliche Wurfgeschwister (C57BL/6N) im Alter zwischen 10 und 21 Wochen verwendet. Als Kontrolltiere dienten ebenfalls männliche WT und Slack-KO Mäuse im entsprechenden Alter. Diese wurden mit dem gleichen Volumen des NMDA-freien Lösemittels (PBS) behandelt. Die quantitative Vermessung (siehe 3.4.2) der Läsionsareale unter Kontrollbedingungen ergab keine genotypabhängigen Unterschiede (siehe 4.1.2, Abbildung 4.2). Die hierbei nachgewiesenen Läsionen entsprechen der Gewebeerstörung durch die Injektionskanüle. Im Vergleich zu den NMDA-induzierten Läsionen fallen die Läsionen unter Kontrollbedingungen reproduzierbar klein aus.

Diese Vorbefunde erlauben die vergleichende Analyse von WT und Slack-KO Mäusen im Rahmen exzitotoxischer Injektionsuntersuchungen. Slack-KO Tiere zeigen in den *in vivo* Versuchen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber der striatalen Applikation von NMDA und entwickeln größere neuronale Läsionen als WT Mäuse (siehe 4.1.2, Abbildung 4.2), weshalb eine neuroprotektive Rolle für Slack postuliert werden kann (siehe 5.3.3).

### 5.1.3 Limitationen der striatalen Injektion von NMDA

Das striatale Injektionsmodell zur Untersuchung der NMDA-induzierten neuronalen Schädigung *in vivo* besitzt, neben den oben genannten Vorteilen, auch einige Einschränkungen bzw. Grenzen. Um den Einfluss verschiedener neuroprotektiver bzw. neurotoxischer Proteine auf die neuronale Schädigung zu untersuchen, wird im Rahmen dieses Modells typischerweise eine Endpunktbestimmung durchgeführt. Dabei wird nach einer gewissen Dauer der exzitotoxischen Schädigung der Versuch beendet und nach Entnahme des Gehirns können Veränderungen in den RNA- bzw. Proteinleveln neurotropher/-toxischer, pro-/antiapoptotischer sowie inflammatorischer Faktoren untersucht werden. Änderung der Expression und Abundanz dieser Faktoren im Verlauf der exzitotoxischen Schädigung verpasst man durch eine solche Endpunktbestimmung. Ein intraindividuellem Vergleich verschiedener Parameter über die Zeit ist somit nicht möglich.

Des Weiteren ist die isolierte Betrachtung einzelner Signalwege sowie zellulärer Kaskaden im Ganztiermodell sehr aufwendig, da diese durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise parakrine Einflüsse, direkte Zell-Zell-Interaktionseffekte sowie hämodynamische Effekte beeinflusst werden. Dadurch kann die Rolle einzelner Faktoren nur schwer herausgearbeitet werden. Auch können diese durch kompensatorische Mechanismen maskiert werden. Aus diesen Gründen wurden das *in vivo* Modell (siehe 3.4) mit der Untersuchung spezifischer Mechanismen in einem *in vitro* Zellkultursystem (siehe 3.5) kombiniert.

## 5.2 Diskussion der *in vitro* generierten Daten

### 5.2.1 Expression von Slack in cerebellären Granularzellen

Um die Mechanismen der Slack-abhängigen Neuroprotektion zu entschlüsseln, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Zellkultursystem etabliert (siehe 3.5), welches die Untersuchung der verschiedenen exzitotoxischen Signalkaskaden in Abhängigkeit der Slack-Aktivität erlaubt. Primäre cerebelläre Granularzellkulturen sind ein verbreitetes System zur Untersuchung verschiedener neuronaler Funktionen *in vitro* (siehe 1.6.1). Die Expression von Slack in der Granularzellschicht des cerebellären Cortex wurde bereits von Bausch et al. gezeigt (Bausch et al. 2015). Um sicherzustellen, dass der Slack-Kanal auch in *in vitro* Kulturen cerebellärer Granularzellen exprimiert wird, wurde die Slack-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene mittels qRT-PCR bzw. IHC-Färbungen nachgewiesen (siehe 4.2.2, Abbildung 4.4). Dabei wurde in den CGC-Kulturen im Vergleich zum gesamten Cerebellum eine geringere Slack-mRNA-Expression detektiert. Eine Erklärung für diese Abweichung in den Expressionsleveln zwischen isolierten Granularzellen und dem Gewebeverband könnten die im Kultursystem fehlenden Impulse der Moosfasern auf die Granularzellen sein (siehe 1.6). Diese tragen durch die exzitatorische Aktivierung der Glutamatrezeptoren in der

Plasmamembran der Granularzellen zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle bei und führen dadurch zur Induktion der Gentranskription bestimmter neurotropher Faktoren (Balázs et al. 1989). Es wäre demnach denkbar, dass auch die Transkription der Slack-mRNA  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert wird. Zwar wurde ein solcher Zusammenhang bislang noch nicht gezeigt, jedoch konnten bereits zwei NFκB-Bindungsstellen in der Promotorregion des zu Slack orthologen Slick-Gens nachgewiesen werden. So kommt es beispielsweise während hypoxischen Zuständen zur vermehrten NFκB-induzierten Slick-Transkription (Tomasello et al. 2015). Zudem muss beachtet werden, dass die relative Expression an mRNA nicht zwangsläufig der Menge an translatiertem Protein entspricht. Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient zwischen mRNA- und Proteinkonzentration beträgt, in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes und angewandten statistischen Tests, ungefähr 0,4. Das bedeutet, dass die Ergebnisse der RNA- und Proteinbestimmungsmethoden, wie z. B. qRT-PCR- und WB-Analyse, zu etwa 40 % übereinstimmen (Tobias et al. 2009, Vogel et al. 2010, Schwanhäusser et al. 2011, Kendrick 2014, Edfors et al. 2016). Eine weitere Erklärung für die Differenz zwischen den Expressionsleveln könnten neben den Granularzellen andere Slack-exprimierende Zelltypen im Cerebellum sein. Die Färbung der Granularzellschicht ist ein sicherer Nachweis für die Expression von Slack in den Zellkörpern der dort lokalisierten Granularzellen, eine Differenzierung zwischen post- und präsynaptischen Slack-Expressionsmustern ist hierdurch jedoch nicht möglich. Daher ist einerseits eine Expression von Slack in der Membran der Somata und Axone von Granularzellen und andererseits in der Membran präsynaptischer Endigungen afferenter Axone der Moosfasern denkbar. Darüber hinaus wurden bereits ähnliche Expressionsunterschiede zwischen Gewebe und Primärkulturen von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Ko et al. 2013, Costabile et al. 2015, Kim et al. 2015). Trotz der Diskrepanz in den Slack-mRNA-Expressionsleveln wurde die Expression des Kanals auf Proteinebene mittels IHC-Färbungen primärer CGC-Kulturen von WT und Slack-KO Mäusen eindeutig nachgewiesen. Daher stellen diese Differenzen in den mRNA-Expressionsleveln kein Problem für den weiteren Fortgang dieser Arbeit dar.

### **5.2.2 Reinheit der CGC-Neuronenkulturen**

Neben dem Nachweis von Slack in den CGC-Kulturen, wurden diese hinsichtlich ihrer Zusammensetzung in Bezug auf die Neuronen- bzw. Gliazellpopulation charakterisiert. Der Anteil an Gliazellen kann sich entscheidend auf die Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten Experimente auswirken. So spielen diese unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration, welche durch die Aufnahme von Glutamat in Gliazellen reduziert wird (siehe 1.4). Auch sezernieren Gliazellen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, Neuromodulatoren sowie Neurohormonen und tragen so zur Ausbildung

der Neuroplastizität bei (Araque und Navarrete 2010, Wang et al. 2016, Jakel und Dimou 2017). Während pathophysiologischer Zustände kommt es zur morphologischen und funktionellen Veränderung der Gliazellen, man spricht dann von aktivierten bzw. reaktiven Gliazellen. Diese sezernieren vermehrt neuroprotektive sowie neurodegenerative Faktoren. Dies bedingt u. a. die Proliferation von Astrozyten und Mikroglia, welche einen Einfluss auf das neuronale Überleben nehmen (Perez-Capote et al. 2004, Jakel und Dimou 2017). In vergleichenden Exzitotoxizitätsstudien an reinen Neuronenkulturen sowie gemischten Neuronen-Gliazell-Kulturen konnten nach exzitotoxischer Stimulation mit zunehmenden Glutamatkonzentrationen Unterschiede im Zellüberleben ausgemacht werden. Während gemischte Neuronen-Gliazell-Kulturen bei niedrigen Glutamatkonzentrationen (10 - 20  $\mu\text{M}$ ) eine deutlich höhere Überlebensrate zeigten als reine Neuronenkulturen, wurde bei hohen Glutamatkonzentrationen (50  $\mu\text{M}$  - 100  $\mu\text{M}$ ) signifikant mehr Zelltod in diesen gemischten Kulturen nachgewiesen und die reinen Neuronenkulturen zeigten ein besseres Überleben (Perez-Capote et al. 2004). Diese Befunde, sowie die zahlreicher anderer Arbeitsgruppen (Rosenberg und Aizenman 1989, Rosenberg et al. 1992, Dugan et al. 1995, Beaman-Hall et al. 1998, Perez-Capote et al. 2004) zeigen einen modulierenden Einfluss von Gliazellen auf die Exzitotoxizität. Der Anteil an Gliazellen in den CGC-Kulturen hat demnach einen großen Einfluss auf das Ausmaß exzitotoxischer Schädigung, weshalb das Verhältnis von Neuronen- und Gliazellpopulation in den Kulturen beider Genotypen stets gleich sein sollte. Entsprechend dem in der Literatur beschriebenen Reinheitsgrad der CGC-Kulturen von ca. 95 % (Krämer und Minichiello 2010) weisen auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kulturen (siehe Abbildung 4.3) hauptsächlich Granularzellen auf und enthalten nur wenig Gliazellen. Die Quantifizierung von IF-Färbungen, welche unter meiner Anleitung von Frau M. Sc. Pharm. Katharina Wild während ihrer Masterarbeit im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben einen neuronalen Anteil von mehr als 90 % (Wild 2016). Auch wurden keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellpopulation von WT und Slack-KO CGC-Kulturen festgestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass mögliche genotypspezifische Unterschiede im Zellüberleben während der Exzitotoxizitätsstudien nicht auf einen unterschiedlichen Anteil an Gliazellen zurückgeführt werden können.

### **5.2.3 Die LDH-Aktivitätsbestimmung zur Quantifizierung der exzitotoxischen Schädigung**

Im Rahmen der Glutamat-induzierten Toxizität kommt es durch die Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren zu einem starken Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration. Nachfolgend werden nekrotische und apoptotische Signalkaskaden aktiviert, die mit der Schwellung der Zellkörper, der mitochondrialen Dysfunktion sowie der

vermehrten Bildung von ROS einhergehen (siehe 1.4). Die Beurteilung des Ausmaßes an neuronaler Schädigung kann durch verschiedene Methoden erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür mikroskopische Betrachtungen der Kulturen vor, während und nach der exzitotoxischen Stimulation sowie die Quantifizierung der freigesetzten LDH-Menge herangezogen. Das cytosolisch lokalisierte Enzym LDH wird nach Ruptur der Zellmembran ins Zellkulturmedium abgegeben und kann nachfolgend unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten Kits quantitativ bestimmt werden (siehe 3.6.2). Da die LDH nur infolge der Zerstörung der Zellmembran freigesetzt wird, dient die Quantifizierung der LDH-Aktivität hauptsächlich der Bestimmung des nekrotischen Zelltods (Chan et al. 2013). Jedoch stellt dies im Rahmen der hier durchgeführten Experimente (siehe 4.3) kein Problem dar, da es in *in vitro* Systemen aufgrund fehlender Phagozyten im Rahmen der Apoptose zur Akkumulation apoptotischer Abbauprodukte und dadurch zur sekundären Nekrose der Zelle kommt (Duke und Cohen 1986, Ankarcona et al. 1995, Bonfoco et al. 1995). Somit erfolgt mittels LDH-Analyse die Erfassung des gesamten Ausmaßes an Zelltod unabhängig von der Art des Zelltods.

Bekannterweise stellt das im Erhaltungsmedium vorhandene Phenolrot einen möglichen Störfaktor des LDH-Assays dar (Wolterbeek und Meer 2005). Daher wird für jede vermessene Probe ein *Blank-Wert* (Erhaltungsmedium) abgezogen, um mögliche ergebnisverfälschende Einflüsse der im Medium enthaltenen Störfaktoren zu eliminieren. Außerdem wird für jeden Versuchsansatz durch die Lyse der Zellen mit 0,9 %-iger Triton X-Lösung die maximal mögliche LDH-Freisetzung bestimmt. Durch die Bezugnahme der jeweiligen LDH-Aktivitäten der unterschiedlichen Versuchskonditionen auf die maximal freigesetzte LDH-Menge werden Unterschiede in der Zelldichte bzw. Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Kulturen relativiert.

#### **5.2.4 Einfluss der verschiedenen iGluRs auf die Exzitotoxizität und Slack-Aktivierung**

Glutamat aktiviert sowohl AMPA- als auch NMDA-Rezeptoren. Einige wissenschaftliche Arbeiten postulieren jedoch, dass der exzitotoxische Zelltod infolge glutamaterger Überstimulation v. a. durch die übermäßige Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Choi 1988, Manev et al. 1989, Meldrum 2000). Studien, bei denen Glutamat zusammen mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 bzw. Memantin appliziert wird, belegen, dass durch die Inhibierung der NMDA-Rezeptoren die Zellviabilität nach Glutamatapplikation deutlich gesteigert werden kann (Simon et al. 1984, Choi 1988, Gillissen et al. 2002, Lipton 2004, Fatokun et al. 2008). In Exzitotoxizitätsstudien an hippocampalen, kortikalen und cerebellären Zellkulturen konnte zudem gezeigt werden, dass das neuronale Überleben infolge kurzer Stimulation mit Glutamat durch die anschließende Blockade der NMDA-



Rezeptoren um etwa die Hälfte gesteigert werden kann (Rothman und Olney 1987, Manev et al. 1989, Choi 1992). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die beobachtete neuronale Schädigung nicht nur durch die kurze Glutamatexposition hervorgerufen wird. Vielmehr kommt es nachfolgend zur endogenen Freisetzung von Glutamat und dadurch bedingt zur gesteigerten Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und zur Potenzierung der neuronalen Schädigung. In Übereinstimmung mit diesen Daten kann eine vergleichbare Neuroprotektion durch die Inkubation der Kulturen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium nach dem Auswaschen des zuvor superfundierten Glutamats erzielt werden (Hartley und Choi 1989). Andere Arbeiten hingegen postulieren, dass die exzessive Stimulation von AMPA-Rezeptoren ebenfalls zu exzitotoxischem Zelltod führt (Frandsen et al. 1989). Diese Kontroverse bezüglich der Beteiligung verschiedener iGluRs an der Exzitotoxizität kann möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Zellkultursysteme und Kultivierungsbedingungen sowie der damit verbundenen unterschiedlichen Zusammensetzung der iGluRs erklärt werden (Frandsen et al. 1989, Liu et al. 2007).

Um herauszufinden, welchen Anteil NMDA- bzw. AMPA-Rezeptoren an der exzitotoxischen Schädigung haben, wurden WT und Slack-KO CGC-Kulturen mit Glutamat in Kombination mit einem NMDA- bzw. AMPA-Rezeptorantagonisten inkubiert (siehe 3.6.1). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (siehe 4.3.2) bestätigen publizierte Daten (Hartley und Choi 1989, White und Reynolds 1996). So wird durch die Co-Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 die Zellviabilität nach Glutamatinkubation signifikant gesteigert. Die relativen LDH-Aktivitäten entsprechen nahezu denen der Kontrollkulturen. Die Zugabe des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX hingegen hatte keinen Einfluss auf das neuronale Überleben während der glutamatergen Exzitotoxizität. Dies spricht dafür, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren die exzitotoxische Schädigung bewirkt, während AMPA-Rezeptoren unter den hier gewählten Bedingungen kaum eine Rolle spielen. Interessanterweise zeigen Slack-KO CGC-Kulturen auch nach Zugabe von Glutamat in Kombination mit NBQX eine höhere Absterberate als WT CGCs. Dies impliziert, dass die Aktivierung von Slack-Kanälen und die dadurch vermittelte genotypabhängige Neuroprotektion auch nach AMPA-Rezeptorblockade bestehen bleibt. Bisher wurde in der Literatur nur die Aktivierung von Slack nach Stimulation von AMPA-Rezeptoren nachgewiesen (Nanou und El Manira 2007, Nanou et al. 2008). Der vorliegende Befund deutet erstmalig auf eine NMDA-Rezeptor-abhängige Aktivierung der Slack-Kanäle hin.

Um diese Interaktion zwischen NMDA-Rezeptoren und Slack zu verifizieren und die neuroprotektive Rolle von Slack genauer zu untersuchen, wurden WT und Slack-KO CGC-Kulturen mit unterschiedlichen NMDA-Konzentrationen inkubiert. Die anschließende Quantifizierung der Zelltodlevel gibt Aufschluss über den Einfluss der Slack-Kanalaktivität auf die NMDA-Rezeptor-abhängige neurotoxische Schädigung. So wurden für Slack-KO CGCs

erneut signifikant größere Zelltodlevel nach Inkubation mit NMDA (50 - 300  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen. Diese Befunde bestätigen die Kopplung von Slack mit NMDA-Rezeptoren sowie die nachgeschaltet Slack-abhängige Mediation neuroprotektiver Mechanismen.

### 5.2.5 NMDA-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in WT und Slack-KO CGCs

Bekanntermaßen führt die Stimulation von NMDA-Rezeptoren zum schnellen Anstieg der  $[\text{Na}^+]_i$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dabei fördert v. a. der exzessive Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration neurodegenerativer Mechanismen im Rahmen exzitotoxischer Prozesse (Sattler und Tymianski 2000, Arundine und Tymianski 2003, Lau und Tymianski 2010). Entsprechend führt die Substitution extrazellulärer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zur nahezu vollständigen Prävention der Neurotoxizität (Choi 1992). Auch wurde mehrfach postuliert, dass das Ausmaß neuronaler Schädigung proportional zur  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist (Hartley et al. 1993, Lu et al. 1996). Andere wissenschaftlichen Arbeiten hingegen kommen zu dem Ergebnis, dass das Ausmaß neuronaler Schädigung nicht nur von der Stärke des  $\text{Ca}^{2+}$ -Overloads, sondern auch von der Eintrittspforte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängt (Sattler et al. 1998). So scheinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die durch NMDA-Rezeptoren in die Zelle einströmen, eine toxischere Wirkung zu besitzen, als solche, die durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Zelle gelangen. Diese Befunde konnten durch die Bestimmung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs sowie die Quantifizierung des Zelltods nach Stimulation kortikaler Kulturen mit verschiedenen Agonisten (u. a. Glutamate, NMDA und AMPA) und gleichzeitiger spezifischer Blockade von NMDA-/AMPA-Rezeptoren bzw. spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Sattler et al. 1998, Sattler und Tymianski 2000) aufgedeckt werden. Demnach scheint v. a. der NMDA-Rezeptor-getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an neurotoxische Signalwege gekoppelt zu sein (Sattler et al. 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden inwiefern die Deletion von Slack Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeation der NMDA-Rezeptoren hat. Aufgrund dessen wurde die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Abhängigkeit der NMDA-Rezeptorstimulation in WT- und Slack-KO Kulturen bestimmt (siehe 4.3.5). Dazu erfolgte zunächst die Bestimmung der basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sowie nachfolgend die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während und nach Stimulation mit verschiedenen NMDA-Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit des Rezeptorantagonisten MK-801. Dabei konnten zwischen WT und Slack-KO CGC-Kulturen basal keine intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsunterschiede festgestellt werden (siehe 4.3.5). Dies spricht dafür, dass die Slack-Ablation keinen Einfluss auf das Membranpotential sowie das elektrochemische Gleichgewicht unter Ruhebedingungen hat. Nach Superfusion der Zellen mit NMDA-haltigen Pufferlösung konnte in Übereinstimmung mit der wissenschaftlichen Datenlage in Slack-profizienten und -defizienten Kulturen ein schneller Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verzeichnet werden. Über die gesamte Dauer der NMDA-Stimulation bleiben die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf einem erhöhten Level, welches durch den anhaltenden Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bestimmt wird. Die beiden

Messkurven der FL Ratio 340/380 von WT und Slack-KO CGCs verlaufen nahezu identisch. Somit scheint die Aktivität der Slack-Kanäle unter den gewählten Versuchsbedingungen (siehe 3.9.2) keinen Einfluss auf die akute  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung zu haben. Daraus kann schlussfolgert werden, dass auch die Aktivierbarkeit sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität von NMDA-Rezeptoren (und spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen) in den Slack-KO Kulturen nicht verändert ist. Die Co-Applikation des Rezeptorantagonisten MK-801 führt trotz anhaltender NMDA-Superfusion zur schnellen Abnahme der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Level bis zum Basalniveau. Dieser Befund bestätigt, dass der initiale Auslöser für die zuvor bestimmte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme NMDA-Rezeptor-abhängig ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen von Sattler et al., die durch Zugabe von MK-801 ebenfalls eine vollständige Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms feststellen konnten (Sattler et al. 1998). Um zu differenzieren welchen Beitrag spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle an dem  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg haben, müssten einerseits die MK-801 Versuche ausgeweitet und andererseits weitere Experimente mit z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern durchgeführt werden (Sattler et al. 1998, Sattler und Tymianski 2000). Zusammengefasst erlauben die bisherigen Befunde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung die Schlussfolgerung, dass Slack die akuten NMDA-medierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten nicht moduliert. Zudem sollte der Einfluss von Slack auf die Regeneration der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Beendigung des NMDA-Stimulus sowie die erneute Aktivierbarkeit der NMDA-Rezeptoren nach einer Auswaschphase untersucht werden (siehe 4.3.5). Glaum et al. haben gezeigt, dass es nach wiederholter Glutamatapplikation zu einem anhaltenden  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg kommt (Glaum 1990). Die mittels FURA-2 gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale verlaufen in den WT bzw. Slack-KO CGC-Kulturen während der Auswaschphase mit Medium nahezu identisch. Auch das Basalniveau wird nach repetitiver NMDA-Stimulation in beiden Genotypen nahezu zeitgleich erreicht. Demnach scheint die kurze aber exzessive Stimulation der Neurone mit NMDA keinen (Slack-abhängigen) Einfluss auf die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (siehe 1.4.1) zu haben. Das infolge der kurzfristigen NMDA-Stimulation noch funktionsfähige  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostasesystem impliziert, dass die bis dato abgelaufenen Schädigungsmechanismen noch reversibel sind (Randall und Thayer 1992). Darüber hinaus kommt es auch nach der wiederholten Stimulation der WT und Slack-KO CGC-Kulturen mit NMDA direkt nach Beginn der NMDA-Applikation zum Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Jedoch fällt der zweite Anstieg in den Kulturen beider Genotypen geringer aus als das erste Maximum des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (siehe 4.3.5). Diese Befunde könnten auf eine Desensibilisierung bzw. Internalisierung der NMDA-Rezeptoren hindeuten. Ähnliche Daten hat bereits Randall et al. erhoben. Auch in dieser Arbeit fiel das Maximum des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals infolge der wiederholten Applikation von Glutamat (für je 5 min) mit jeder Wiederholung geringer aus. Neben einer möglichen NMDA-Rezeptor Desensibilisierung kann dies durch eine längere Regenerationsphase bis zur erneuten Aktivierbarkeit der Rezeptoren erklärt werden (Randall und Thayer 1992). Aufgrund

des nahezu simultanen Verlaufs der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Slack-KO und WT CGCs scheint ein direkter Einfluss von Slack auf die Desensibilisierung und Regeneration der NMDA-Rezeptoren ausgeschlossen zu sein.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit für beide Versuchssetups gewählte, relativ kurze Zeitspanne zur Bestimmung der NMDA-abhängigen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lässt keine Rückschlüsse auf potentielle Slack-vermittelte Unterschiede während der verzögerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Deregulation (siehe 1.4.1) zu. So wird in der Literatur eine Zeitspanne von 18 - 24 h bis zur vollständigen Entwicklung der verzögerten Neurotoxizität angegeben (Randall und Thayer 1992). Die Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über einen so langes Zeitintervall ist jedoch aus technischen Gründen nicht möglich. So kommt es u. a. zum Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2-AM und zur exzitationsbedingten Fototoxizität während längeren Messintervallen. Des Weiteren kommt es im Verlauf der Exzitotoxizität zu nekrotischen Veränderungen der Zellmorphologie wie z. B. der Schwellung der Zellsomata (Rothman 1985). Eine Fokussierung auf einzelne Zellen während eines so langen Messintervalls ist dadurch nahezu unmöglich. In Studien an primären hippocampalen Neuronen wurde nach kurzer Glutamatstimulation die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für die nachfolgenden 3 h bestimmt. Dabei konnte für etwas weniger als die Hälfte der Zellen nach ca. 1 - 3 h ein verzögerter Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, der zum sicheren Zelltod führt, festgestellt werden (Randall und Thayer 1992). In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass die zur Induktion der Exzitotoxizität verwendeten NMDA- und Glutamatkonzentrationen sowie die Inkubationsdauer in Abhängigkeit vom gewählten primären Zellkultursystem stark variieren können. So erfolgt die Induktion der Exzitotoxizität in primären kultivierten Hippocampusneuronen (Vornov et al. 1991, Randall und Thayer 1992, Bevers et al. 2009) sowie kortikalen Neuronen (Choi 1988, Dawson et al. 1991, Choi 1992, Bonfoco et al. 1995) im Vergleich zu cerebellären Granularzellen (Garthwaite und Garthwaite 1990, Bessho et al. 1994, Perez-Capote et al. 2004) meist mit höheren Konzentrationen an NMDA oder Glutamat, jedoch für einen kürzeren Zeitraum von nur 5 - 30 min. Ein denkbare Setup zur Untersuchung des Einflusses von Slack auf den Verlauf der toxischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Deregulation wäre die Präinkubation der CGC-Kulturen mit NMDA und die anschließende Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an unterschiedlichen Zeitpunkten. Aufgrund des fehlenden Bezugs zur *Baseline* müsste dafür allerdings zunächst die Kalibrierung des Messstandes erfolgen, um anschließend die gemessene Fluoreszenzratio 340/380 in absolute  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  umrechnen zu können.

## 5.2.6 NMDA-abhängige mRNA-Expressionsanalyse und Aktivierung der TrkB-Signalwege in WT und Slack-KO CGCs

### Slack-Ablation beeinflusst die NMDA-abhängige Genexpression

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen dienen der Aufdeckung möglicher molekularer Mechanismen, die an der Slack-abhängigen Neuroprotektion beteiligt sind. Eine Induktion der Genexpression von Slack-mRNA-Transkripten oder Transkripten anderer Slo-Kaliumkanäle im Verlauf der exzitotoxischen Stimulation könnten darauf hindeuten, dass diese im Rahmen der Exzitotoxizität eine neuroprotektive Rolle besitzen. Die Quantifizierung der mRNA-Expressionslevel neuronal exprimierter K<sup>+</sup>-Kanäle der *Slo*-Genfamilie (siehe 4.3.6) sowie pro- bzw. antiapoptotischer Faktoren der Bcl-2-Familie (siehe 4.3.7) ergab einen leichten Anstieg der mRNA-Expression dieser Gene in WT CGC-Kulturen nach 1 h bzw. v. a. nach 6h NMDA-Inkubation. Darüber hinaus konnten in den WT Kulturen für verschiedene Neurotrophine und ihre korrespondierenden Rezeptoren (siehe 4.3.8) im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität nach 6 h stark erhöhte Expressionslevel nachgewiesen werden. In Slack-KO CGCs war entweder keine oder nur eine geringe Expressionsänderung detektierbar. Somit scheint ein Zusammenhang zwischen der neuroprotektiven Wirkung von Slack und der Exzitotoxizitäts-abhängig gesteigerten Transkription zu bestehen. Der Mechanismus, der hinter diesen Befunden steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die sich aus diesen Befunden ergebende Arbeitshypothese, zur möglichen Einflussnahme von Slack auf die Genregulation, wird später diskutiert (siehe 5.3.1).

### Zusammenhang zwischen Slack-abhängiger Neuroprotektion und einem gesteigerten TrkB-Signalling

Neurotrophine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des Neuronensystems, da sie an zahlreichen Prozessen wie dem Zellüberleben sowie der Differenzierung von Neuronen beteiligt sind (Snider und Johnson 1989, Lewin und Barde 1996, Segal und Greenberg 1996, Huang und Reichardt 2001). Die zelluläre Transmission der neurotrophen Signale erfolgt durch Bindung der Neurotrophine an einerseits Rezeptoren der Trk-Familie und andererseits den p75 Neurotrophinrezeptor (siehe 1.4.4) (Chao 2003). Sowohl in WT als auch Slack-KO CGC-Kulturen kommt es v. a. infolge 6-stündiger NMDA-induzierter Exzitotoxizität zur Hochregulation der BDNF- und NT-3-mRNA-Level um das 5- bzw. das 2-fache (siehe 4.3.8, Abbildung 4.16). Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse bereits publizierter Arbeiten, die auf eine gesteigerte Synthese (Rudge et al. 1998) und Freisetzung von BDNF (Jiang et al. 2003) infolge der exzitotoxischen neuronalen Aktivität hinweisen. Darüber hinaus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit stark erhöhte

Expressionslevel der beiden Trk-Rezeptoren (TrkB und TrkC) in WT CGC-Kulturen nachgewiesen. Dahingegen bleibt eine solche Änderung der Expressionslevel in Slack-KO Kulturen aus (siehe Kapitel 4.3.8, Abbildung 4.16). Diese Befunde führen zur Annahme, dass die Aktivität des Slack-Kanals in Zusammenhang mit den Änderungen der Expressionslevel im WT steht. Um diese Frage eindeutig beantworten zu können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Daher wurde nachfolgend untersucht, ob die exogene Zufuhr von BDNF den neuroprotektiven Effekt verstärken kann (siehe 4.3.9). Aufgrund der selektiven Hochregulation von TrkB-mRNA in WT Neuronen wurde angenommen, dass durch die Zugabe von BDNF, welches über TrkB-Rezeptoren neuroprotektive Signalkaskaden aktiviert, das neuronale Überleben von WT Neuronen nach NMDA-Stimulation im Vergleich zu dem von Slack-KO Neurone stärker gesteigert werden kann. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur Inkubation mit NMDA alleine, führte die Co-Applikation von BDNF zusammen mit NMDA zu keiner Veränderung des neuronalen Überlebens in WT und Slack-KO CGCs (siehe Abbildung 4.17). Diese Befunde sind konsistent mit einigen Publikationen, in denen gezeigt wurde, dass BDNF neuroprotektiv wirkt wenn es vor dem exzitotoxischen Stimulus appliziert wird (Cheng und Mattson 1994, Han et al. 2000, Almeida et al. 2005). Dabei sind die beobachteten neuroprotektiven Effekte abhängig von der applizierten BDNF-Konzentration (Cheng und Mattson 1994). Auch wurden in BDNF-prästimulierten (> 6 h) CGC-Kulturen nach NMDA-Superfusion geringere  $[Ca^{2+}]_i$ -Level gemessen als in Kulturen ohne BDNF-Prästimulation bzw. BDNF-Präinkubation für < 3 h (Brandoli et al. 1998). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Tendenz zum gesteigerten neuronalen Überleben nach Prästimulation der Neurone mit BDNF beobachtet werden. Allerdings war das hier beobachtete Ausmaß des Zellschutzes in den Slack-KO CGCs größer als in den WT Neuronen (siehe Abbildung 4.17). Ursächlich hierfür könnte die in WT CGCs selektive Hochregulation von TrkB-Transkripten sein. Zusammen mit den gesteigerten BDNF-mRNA-Leveln bedingt diese vermutlich eine maximale Aktivität des BDNF-TrkB-Signalwegs, weshalb exogen zugeführtes BDNF zu keiner weiteren Steigerung des Zellüberlebens führt. Um herauszufinden, ob die verminderten Zelltodlevel im WT tatsächlich auf den, im Vergleich zu den Slack-KO CGCs, höheren TrkB-Expressionsleveln beruhen, wäre die Wiederholung der NMDA-Exzitotoxizitätsstudie bei gleichzeitiger Blockade der TrkB-Rezeptoren sinnvoll. Entsprechend zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Arbeiten, dass die Blockade der endogenen BDNF-Aktivität zu einer Zunahme des Zelltods führt (Rudge et al. 1998, Xuan et al. 2004, Lau et al. 2015).

Trotz der eben diskutierten Befunde ist eine Slack-vermittelte Regulation endogener BDNF-TrkB-abhängiger zellulärer Signalkaskaden denkbar. Bekanntermaßen bestimmen die

Expressionslevel der Neurotrophine während der neuronalen Entwicklung das Gleichgewicht zwischen dem zellulären Überleben und apoptotischen Mechanismen. Die Interaktion von BDNF und TrkB führt u. a. zur Aktivierung verschiedener Kinasen die letztendlich den Phosphorylierungszustand von Akt und ERK bestimmen (siehe 1.4.4) (Dudek et al. 1997, Bonni et al. 1999, Encinas et al. 1999, Hetman et al. 1999, Han und Holtzman 2000). Die phosphorylierten Akt- und ERK-Proteine können einerseits Apoptose-induzierende Faktoren wie Bad, Bax sowie die Caspase-3 inhibieren oder in den Zellkern translozieren und dort durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise CREB die Expression neuroprotektiver Gene fördern (Lu und Xu 2006).

Um aufzuklären, ob die nachgewiesenen genotypabhängigen Unterschiede in der Regulation der TrkB-mRNA-Expressionslevel zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Akt und ERK in WT bzw. Slack-KO CGCs beitragen, wurde das Verhältnis von pAkt/Akt und pERK/ERK im Verlauf der exzitotoxischen Stimulation untersucht. Bekanntermaßen spielen diese beiden Signalwege im Rahmen verschiedener neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Huntington Erkrankung (Gines et al. 2010, Ribeiro et al. 2010) oder cerebralen Ischämie (Wang et al. 2004) eine wichtige Rolle. In Zusammenhang mit der BDNF-abhängigen Aktivierung dieser Signalwege wurde mehrfach gezeigt, dass v. a. die Aktivierung des ERK-Signalwegs zur Neuroprotektion beiträgt (Han und Holtzman 2000, Maher et al. 2011) und andererseits die Blockade der ERK-Kaskade zu vermehrtem neuronalen Zelltod führt (Maher et al. 2011). In der Tat führt die Induktion von Exzitotoxizität (siehe Abschnitt 4.3.10, Abbildung 4.20) zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK und trägt dadurch zu einem gesteigerten neuronalen Überleben bei (Ortuño-Sahagún et al. 2014). Dabei führt die genetische Ablation des Slack-Kanals zu einer verminderten Aktivierung des ERK-Signalwegs. In diesem Zusammenhang sind die Befunde der Arbeitsgruppe um Eil et al. von großem Interesse. Diese zeigen für T-Zellen von Tumorgewebe infolge leicht erhöhter  $[K^+]_i$  eine vermehrte Aktivität der Serin/Threonin Phosphatase PP2A, woraus eine verminderte Phosphorylierung von Akt resultiert. Auch konnte nach Überexpression des spannungsabhängigen  $K_v1.3$ -Kanals und dem dadurch bedingten gesteigerten  $K^+$ -Efflux ein vermehrtes Akt-mTOR-*Signalling* beobachtet werden (Eil et al. 2016). In primären Kulturen hippocampaler/kortikaler Neuronen kommt es nach Glutamatapplikation zu einer massiven Reduktion der  $[K^+]_i$ . Diese mittels FRET-basiertem  $K^+$ -Sensor (KIRIN) bestimmte Abnahme der  $[K^+]_i$  liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass Phosphatasen (wie beispielsweise PP2A) während exzitotoxischer Prozesse in WT CGCs weniger aktiv sind als in Slack-KO Neuronen und daher bestimmte Phosphorylierung stärker sein könnten (Shen et al. 2018). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte, entgegen den genotypspezifischen Unterschieden in der NMDA-induzierten Phosphorylierung von ERK, nur eine Tendenz der gesteigerten Phosphorylierung von Akt im WT beobachtet werden. Es

zeigen sich keine signifikanten genotypabhängigen Unterschiede (siehe Abbildung 4.19). Somit kann angenommen werden, dass dieser Signalweg keinen Einfluss auf die Slack-abhängigen Differenzen im neuronalen Überleben der WT und Slack-KO CGCs nach NMDA-Exzitotoxizität hat.

Neben der Aktivierung der Akt- und ERK-Signalwege wurde zudem die Phosphorylierung des *Downstream-Targets* CREB untersucht. Genotypabhängige Unterschiede ließen sich dabei nicht feststellen. Allerdings führt die Stimulation der CGC-Neurone mit NMDA zu einer drastischen Abnahme der Gesamt-CREB-Proteinlevel. Abgesehen von einigen technischen Schwierigkeiten (Probleme mit der Detektion der Gesamt-CREB-Proteinlevel) scheint es daher unwahrscheinlich, dass die genetische Ablation von Slack einen Einfluss auf die Phosphorylierung von CREB hat.

### **5.3 Potentielle Mechanismen der Slack-abhängigen Neuroprotektion**

#### **5.3.1 Hypothese für eine Slack-abhängige Regulation der Genexpression**

Abgeleitet aus den Ergebnissen dieser Arbeit (siehe 4.3.6, 4.3.7 und 4.3.8) kann ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Slack-Kanälen und einer Änderung der aktivitätsabhängigen Genexpression angenommen werden. Interessanterweise konnte für den ebenfalls neuronal exprimierten und mit Slack verwandten BK-Kanal bereits die Expression in der inneren nukleären Membran (INM) sowie ein Zusammenhang zwischen der exzitatorischen Kanalaktivität eines nukleären BK-Kanals (nBK) und der Regulation der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Nukleoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nu}}$  spielt als wichtiger Faktor der aktivitätsabhängigen Genexpression eine entscheidende Rolle im Rahmen langanhaltender adaptiver Prozesse, wie der synaptischen Plastizität und aktivitätsabhängigen Neuroprotektion. Der perinukleäre Raum zwischen der inneren und äußeren (ONM) nukleären Membran der Kernhülle dient als funktioneller nukleärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Li et al. 2014, Li und Gao 2016). Nach Aktivierung von INM-ständigen  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) sowie Ryanodin-Rezeptoren (RyR) kommt es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  ins Nukleoplasma und zur  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase IV (CaMKIV)-induzierten Phosphorylierung von CREB. Dies wiederum führt u. a. zur Transkription neuroprotektiver/neurotoxischer Gene. Zudem führt der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nu}}$ -Anstieg zur Aktivierung von nBKs, welche einen regulatorischen Einfluss auf das nukleären Transmembranpotential ( $\Delta\Psi_n$ ) haben. So kommt es infolge der Aktivierung von nBK zum  $\text{K}^+$ -Ausstrom aus dem Nukleoplasma in den perinukleären Raum sowie zur Hemmung von Ryanodin-Rezeptoren und dem weiteren Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die Blockade von nBKs während normaler neuronaler Aktivität führt zum Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nu}}$  und dadurch bedingt zur gesteigerten CREB-Phosphorylierung und Genexpression. Dahingegen bedingt die nBK-Blockade während gesteigerter neuronaler Aktivität eine signifikante Abschwächung des



$[Ca^{2+}]_{nu}$ -Anstiegs, der CREB-Phosphorylierung und der Gentranskription. Dieser etwas kontroverse Befund kann dadurch erklärt werden, dass es infolge der nBK-Blockade zu einer vollständigen Entleerung der nukleären  $Ca^{2+}$ -Speicher kommt. Daher ist während der nachfolgenden neuronalen Aktivität die Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Nukleoplasma sowie die Phosphorylierung von CREB reduziert. Nukleäre BK-Kanäle besitzen demnach eine entscheidende regulatorische Funktion in der Homöostase  $[Ca^{2+}]_{nu}$ -abhängiger Signalkaskaden (Hardingham et al. 2001, Li et al. 2014, Li und Gao 2016). Im Rahmen exzitotoxischer neuronaler Aktivität beispielsweise kann die Aktivierung von nBK-Kanälen ein Überschießen der  $[Ca^{2+}]_{nu}$  und die nachfolgende Expression zellschädigender Gene verhindern.

Bislang wurde die Expression nukleärer Slack-Kanäle noch nicht nachgewiesen. Aufgrund jüngster Befunde, welche die Existenz des ebenfalls  $Na^+$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals Slick in der Membran intrazellulärer Organellen zeigen (Smith et al. 2018), ist jedoch auch eine nukleäre Expression von Slack denkbar. Bislang kann jedoch nur spekuliert werden, dass nukleäre Slack-Kanäle eine ähnliche Funktion wie nBK-Kanäle einnehmen könnten. Analog zu nBK könnten nukleäre Slack-Kanäle die Aktivität nukleärer  $Ca^{2+}$ -abhängiger Rezeptoren und damit die  $[Ca^{2+}]_{nu}$  beeinflussen und dadurch die Genexpression regulieren.

Andererseits könnte die Interaktion des Phactr1 (*phosphatase and actin regulator 1*)-Proteins mit dem C-Terminus des Slack-Kanals eine mögliche Erklärung für die WT-spezifische gesteigerte Genexpression liefern. So stellt diese Interaktion einen direkten *Link* zwischen der Slack-Kanalaktivität und intrazellulären Signalwegen dar. Dabei kommt es nach Aktivierung des Slack-Kanals zur Dissoziation des Signalproteins Phactr1 vom Kanal. Phactr1 ist ein Proteinphosphatase 1 (PP1) bindendes Protein. Die Bindung von Phactr1 an die PP1 führt zur Inhibierung dieser Serin-/Threonin-Phosphatase (Allen et al. 2004). Dadurch ist eine indirekte Regulation der Phosphorylierung von Slack durch Phactr1 wahrscheinlich. Zudem könnte Phactr1 nach der Dissoziation vom Slack-Komplex auch mit anderen Membran-assoziierten bzw. cytoplasmatischen *Targets* wechselwirken (Fleming et al. 2016). Diese Befunde stellen ein wichtiges Indiz für die Kopplung der Slack-Aktivität im Rahmen der neuronalen Erregung mit nachgeschalteten Signalkaskaden dar. In Bezug auf unsere Daten könnte diese Interaktion eine mögliche Erklärung für die Neuroprotektion von Slack durch einerseits eine gesteigerte Aktivität des Kanals infolge anhaltender Phosphorylierung und andererseits für eine Slack-abhängige Zunahme der Genexpression sein. So ist eine Dissoziation von Phactr1 infolge der exzitotoxizitätsbedingten Aktivierung von Slack denkbar. Nachfolgend könnte Phactr1 die PP1-induzierte Hydrolyse von beispielsweise pCREB und anderen Transkriptionsfaktoren verhindern (Gao et al. 2009) und so die Transkription verschiedener Gene fördern.

Neben der potentiellen Beteiligung des Slack-Kanals im Rahmen der Gentranskription ist bereits ein *Link* zwischen Slack und der Proteinbiosynthese bekannt. Es konnte nachgewiesen werden, dass der C-Terminus von Slack mit FMRP interagiert (siehe 1.5.3). Diese Interaktion führt u. a. zur Steigerung der Kanalaktivität. Da es sich bei FMRP um ein mRNA-Bindungsprotein handelt, ist es denkbar, dass diese Interaktion die Translation bestimmter Proteine regulieren kann. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Slack-FMRP Komplexe mRNA von verschiedenen *Targets* des FMRP enthalten, wie z. B. *Map1* und *Arc*. Interessante Befunde, die ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der Slack-Aktivität und der Regulation der aktivitätsabhängigen Proteinsynthese durch den FMRP-RNA Signalweg hindeuten, wurden durch Untersuchungen an BC-Neuronen erlangt. Diese zeigen nach elektrischer Stimulation ein charakteristisches Muster neuronale Erregbarkeit. So kommt es nach einer 30-minütigen Erregungsphase zu einer langen inhibitorischen Phase (~ 18 h). Die *Downregulation* von Slack führt ebenso wie die Applikation des Proteinsyntheseinhibitors Anisomycin dazu, dass die Neurone nicht wieder erregt werden können. Somit scheint die Regeneration dieser BC-Neurone an die aktivitätsabhängige Slack-getriggerte Neusynthese von Proteinen gekoppelt zu sein (Zhang et al. 2012, Kaczmarek 2013).

### 5.3.2 Bekannte zellprotektive Mechanismen verschiedener K<sup>+</sup>-Kanäle

#### Einfluss der K<sup>+</sup>-Kanal-abhängigen Stabilisation des Membranpotentials auf die Neuroprotektion

In *in vitro* sowie *in vivo* Modellen exzitotoxischer Neuronenschädigung wurde für einige K<sup>+</sup>-Kanäle bereits eine neuroprotektive Beteiligung aufgezeigt. So konnten beispielsweise für die Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanäle mit geringer Leitfähigkeit (*small conductance potassium-channels*, KCNN, SK1-3, K<sub>Ca</sub>2) neuroprotektive Eigenschaften in verschiedenen Modellsystemen nachgewiesen werden. Interessanterweise kommt es in dendritischen Dornen von Neuronen zur Expression von K<sub>Ca</sub>2-Kanälen in unmittelbarer Nähe zu NMDA-Rezeptoren. Diese K<sup>+</sup>-Kanäle werden zudem bereits infolge eines geringen Anstiegs der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (K<sub>D</sub> ~ 0,5 µM) aktiviert (Adelman et al. 2012), wodurch es zur Induktion der Nachhyperpolarisation und Regulation der physiologischen Erregbarkeit der Zellmembran kommt. Dabei stellt die langanhaltende Nachhyperpolarisation sowohl unter physiologischen (Stocker 2004) als auch unter pathologischen Bedingungen einen *Feedback*-Kontrollmechanismus dar, der die NMDA-Rezeptoraktivität reduziert (Faber et al. 2005, Ngo-Anh et al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass K<sub>Ca</sub>2-Kanäle nach Aktivierung modulierend in die pathologische Deregulation der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nach Glutamataexposition eingreifen. Darüber ist bekannt, dass die Induktion der Exzitotoxizität innerhalb weniger Stunden zur *Downregulation* von K<sub>Ca</sub>2.2 (SK2)-Kanälen führt. Dies kann durch die gezielte

Aktivierung der Kanäle parallel zur Glutamatexposition unterbunden werden. Die so konservierte Expression von  $K_{Ca2.2}$  führt zur Reduktion der pathologischen  $[Ca^{2+}]_i$  und nachfolgend zur Neuroprotektion (Dolga et al. 2011).

Ähnliche Befunde liegen auch für den eng mit Slack verwandten  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanal großer Leitfähigkeit (*big potassium-channel*, BK, KCNMA1, Slo1) vor (siehe 1.5). Dieser wird im ZNS ubiquitär exprimiert und ist dort u. a. in der präsynaptischen Membran, dem Soma und den Dendriten von Neuronen lokalisiert (Knaus et al. 1996). Eine Beteiligung des BK-Kanals an der Repolarisation sowie der schnellen Nachhyperpolarisation (fAHP) von Aktionspotentialen z. B. in Purkinjezellen des Cerebellums wurde bereits nachgewiesen (Swensen und Bean 2003, Womack und Khodakhah 2004). Die Deletion des BK-Kanals führt nach cerebraler Ischämie sowie kortikaler NMDA-Injektion zu größeren Läsionsarealen (Liao et al. 2010). Dabei wird postuliert, dass der BK-Kanal infolge der exzessiven Depolarisation der Membran sowie dem extremen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert wird und als eine Art „Notbremse“ fungiert. So kann die BK-Kanalaktivität über einen negativen Rückkopplungsmechanismus einerseits den  $Ca^+$ -Einstrom über die postsynaptische Membran und andererseits die präsynaptische Freisetzung von Neurotransmittern (z. B. Glutamat) regulieren (Marrion und Tavalin 1998, Grunnet und Kaufmann 2004, Bentzen et al. 2014). In einer Arbeit zur Untersuchung der neuroprotektiven Rolle des BK-Kanals wird schlussgefolgert, dass die in den BK-KO Mäusen beobachteten größeren neuronalen Läsionen infolge der NMDA-Injektion durch die ungehinderte Ausbreitung der Aktionspotentiale und den dadurch bedingten vermehrten Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen sowie die fehlende negative Rückkopplung auf NMDA-Rezeptoren hervorgerufen wird (Liao et al. 2010). Zudem konnte Liao et al. in einem *in vitro* Ischämiemodell hippocampaler Schnittkulturen eine BK-abhängige Neuroprotektion, welche auf den Einfluss des Kanals auf die AHP zurückgeführt werden kann, nachweisen. So führt die Deletion von BK zur vermehrten akuten (4 h - 8 h) sowie verzögerten (24 h - 72 h) neuronalen Schädigung (Liao et al. 2010). Darüber hinaus konnte in einer NMDA-Exzitotoxizitätsstudie eine durch Leptin-induzierte BK-abhängige Neuroprotektion aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den *in vivo* Befunden von Liao et al. führt die NMDA-Inkubation in den kultivierten kortikalen BK-KO Neuronen jedoch zu keiner größeren Neuronenschädigung als in WT Kulturen. Auch bewirkt die Blockade des BK-Kanals in WT-Neuronen keine Steigerung der NMDA-Exzitotoxizität. Diese Befunde implizieren, dass BK-Kanäle, trotz ihrer Beteiligung an der Leptin-abhängigen Neuroprotektion, unter basalen Bedingungen nicht zur Verringerung der NMDA-Toxizität *in vitro* führen (Mancini et al. 2014).

Auch für die spannungsabhängigen KCNQ-Kanäle (Tatulian et al. 2001) sowie die  $K_{ATP}$ -Kanäle (Ortega et al. 2012) wurden neuroprotektive Funktionen beobachtet.  $K^+$ -Kanäle

scheinen dementsprechend generell sehr gute Kandidaten für eine Zellprotektion im Rahmen neuronaler Schädigungsmechanismen zu sein.

### **Beteiligung mitochondrialer K<sup>+</sup>-Kanäle an der Zellprotektion**

Wachsende Aufmerksamkeit erlangen derzeit intrazelluläre K<sup>+</sup>-Ionenkanäle, wie beispielsweise die intrazellulären BK-Kanäle (iBK). So ist bekannt, dass der in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) der Kardiomyozyten lokalisierte, mitochondriale BK-Kanal (mBK) im Rahmen kardiopathologischer Prozesse eine protektive Rolle einnehmen kann. Die genauen Mechanismen dieser mBK-abhängigen Kardioprotektion sind noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass es aufgrund des K<sup>+</sup>-Einstroms ins Mitochondrium zu einer partiellen Depolarisation der IMM kommt (Aon et al. 2010). Dies führt zur Abnahme der Ca<sup>2+</sup>-Ionen-Triebkraft über die IMM und dadurch zur Reduktion der Ca<sup>2+</sup>-Überladung während beispielsweise ischämischer Prozesse sowie der Reoxygenierung der Zelle (Sato et al. 2005, Singh et al. 2013). Des Weiteren haben Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus dem Herzen sowie aus Neuronen ergeben, dass die Stimulation der BK- und mBK-Kanäle zu einer verminderten ROS-Produktion führt (Kulawiak et al. 2008, Heinen et al. 2014). ROS trägt, wie in Abschnitt 1.4.21.4 beschrieben, durch Schädigung verschiedener Proteine, einer Reduktion der ATP-Synthese sowie der Öffnung der mPTP zur Glutamatrezeptor-vermittelten Exzitotoxizität bei. Darüber hinaus wird angenommen, dass die durch die Aktivierung des mBK bedingte hohe intramitochondriale K<sup>+</sup>-Konzentration sowie die Depolarisation des Membranpotentials dem Einstrom von Protonen in die Mitochondrienmatrix entgegenwirken. Dies bewirkt eine leichte Entkopplung der Atmungskette, wodurch geringe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies entstehen (Stowe et al. 2006). Die dadurch begünstigte Aktivierung der PKC $\epsilon$  könnte ihrerseits die Öffnung der mPTP verhindern (Costa und Garlid 2008). Bislang wurde die mBK-abhängige Protektion vor allem nach ischämischer Schädigung im Herzen oder Kardiomyozyten gezeigt. Aufgrund der bereits nachgewiesenen Expression von mBK Kanälen in der IMM von Neurone, könnten jedoch ähnliche neuroprotektive Mechanismen infolge cerebraler Ischämie oder exzitotoxischer Schädigung ablaufen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität deuten auf eine Slack-abhängige Regulation der BK-mRNA-Expressionslevel hin. So kommt es im Verlauf der Exzitotoxizität in Slack-KO Zellen zur vermehrten *Downregulation* der BK-mRNA-Expression (siehe 4.3.6). Ob diese Reduktion der Genexpression mit einer verminderten Bildung funktioneller mBK- oder Plasmamembran-assoziierten BK (pmBK)-Kanälen einhergeht, wurde bisher nicht weiter untersucht. Somit kann nur spekuliert werden, ob mBK-Kanäle an der für WT CGC-Kulturen im Vergleich zu Slack-KO CGCs gesteigerten Neuroprotektion beteiligt sind. Höhere mBK-Expressionslevel

könnten beispielsweise zur Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Overloads und der ROS-Formation führen. Andererseits ist auch eine mitochondriale Expression von Slack denkbar. So konnte erst kürzlich die Expression des eng mit Slack verwandten Slick-Kanals in der IMM im Herzen nachgewiesen werden (Smith et al. 2018). *In vitro* Ischämie- und Reperfusionsexperimente an Mitochondrien, isoliert aus WT bzw. Slick-KO Kardiomyozyten, liefern Evidenz für eine Beteiligung des mitochondrialen Slick-Kanals an kardialen Protektionsmechanismen. So wird postuliert, dass es infolge des cytoplasmatischen Anstiegs von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $[\text{Na}^+]_i$  v. a. durch die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Monocarboxylat-Transporters (MCT) zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Mitochondrienmatrix kommt. Während pathologischer Zustände kann die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Matrix so stark ansteigen, dass es zur Aktivierung mitochondrialer  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanäle kommt. Der dadurch bedingte  $\text{K}^+$ -Einstrom in die Matrix führt ähnlich wie nach Aktivierung von mBK-Kanälen zur partiellen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und zur Abnahme der Triebkraft für die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und die NCX-Aktivität. Mitochondriale Slick-Kanäle fungieren demnach ebenso wie mBK-Kanäle als Sicherheitsventil um ein mitochondriales Ionenungleichgewicht zu verhindern (Smith et al. 2018). Dieser Befund ist der erste nachgewiesene Zusammenhang zwischen intrazellulär lokalisierten  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanälen und der Aktivierung zellulärer Protektionsmechanismen. Die vorliegenden Daten (siehe 4.1 und 4.3), deuten auf einen ähnlichen Protektionsmechanismus via mitochondrialer Slack-Kanäle in Neuronen hin. Um dies genauer zu untersuchen müsste zunächst die mitochondriale Expression von Slack nachgewiesen werden. Dies könnte, nach Isolation von Mitochondrien aus Neuronen, anhand von Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR, Proteinanalysen anhand von WB-Experimenten und immunhistochemischen Färbungen mit Slack Primärantikörpern, sowie elektrophysiologischen Untersuchung überprüft werden. Darüber hinaus könnte der Einfluss von Slack-Kanälen auf mitochondriale neuroprotektive Mechanismen während exzitotoxischer Schädigung mittels respiratorischer Messungen an Mitochondrien aus WT bzw. Slack-KO Neuronen untersucht werden.

### 5.3.3 Potentielle neuroprotektive Mechanismen des Slack-Kanals

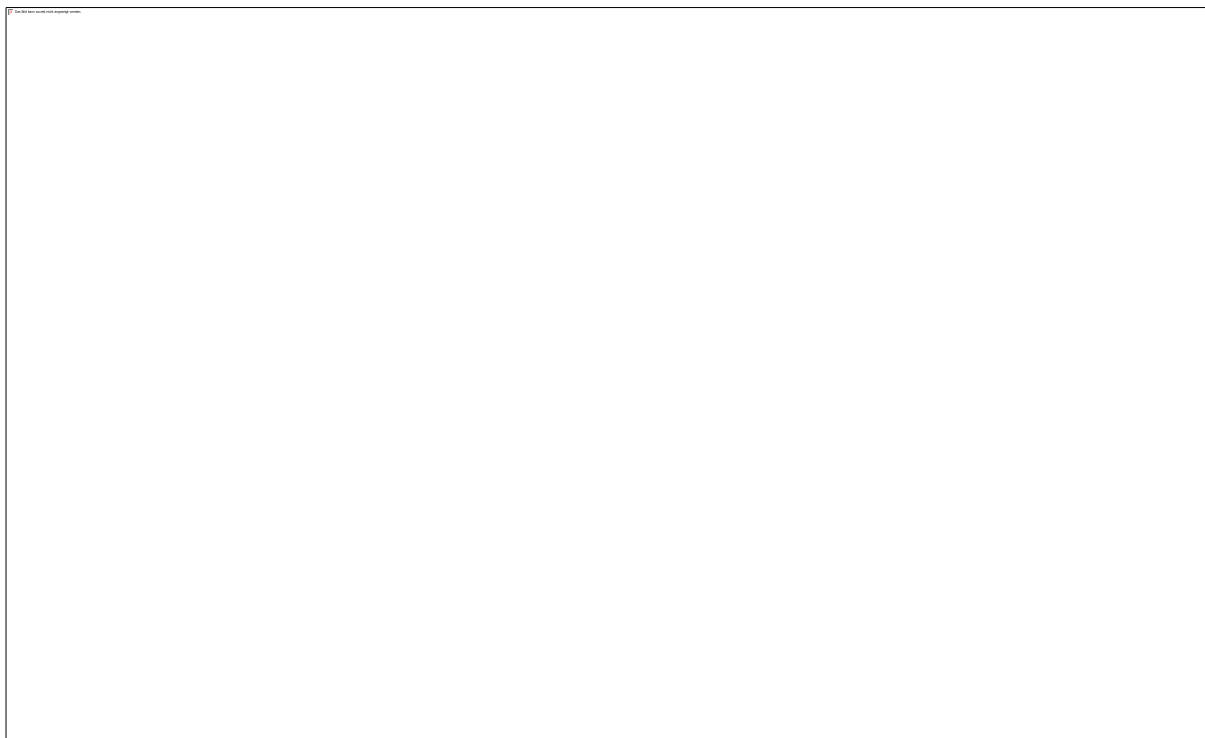
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit induzierte exzitotoxische Neuronenschädigung wird zum Teil durch den Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle sowie die nachfolgende osmotische Schwellung des Somas sowie der Zellorganellen bedingt (Rothman 1985, Choi et al. 1987). Dieser initiale nekrotische Schädigungsmechanismus der Neurone ist bis zu einem bestimmten Punkt noch reversibel (Choi 1992). Allerdings ist die Bedeutung der osmotischen Zellschwellung *in vitro* vermutlich höher als unter *in vivo* Bedingungen. Die im Vergleich zur Zellarchitektur im Zellverband recht offene Vernetzung der Neurone in Kultur erlaubt ein übertriebenes Anschwellen der Zellen (Choi 1992). Zudem fehlen in Neuronenkulturen, wie

bereits in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, Phagozyten und andere Fresszellen um die apoptotischen Abbauprodukte zu eliminieren.

Neben dem Einstrom an  $\text{Na}^+$ -Ionen kommt es zudem zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, wodurch einerseits Mechanismen zur Aufrechterhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und andererseits verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige neuroprotektive und neurotoxische Signalkaskaden angestoßen werden. Während der initiale Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reversibel ist, führt die anhaltende Aktivierung der iGluRs zur verzögerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Deregulation und zum sicheren Zelltod (Choi 1992, Randall und Thayer 1992, Sattler und Tymianski 2000). Slack könnte möglicherweise v. a. während der frühen  $\text{Na}^+$ -getriggerten Phase der exzitotoxischen Schädigung intervenieren und der Neurodegeneration entgegenwirken. So wurde bereits eine funktionelle Kopplung der Slack-Kanäle mit dem ionotropen Glutamatrezeptor AMPA nachgewiesen (siehe 1.5.4). Zudem konnte eine gehäufte Expression von Slack-Kanälen in der Nähe spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle sowie nicht-selektiver Ionenkanäle gezeigt werden (Kaczmarek 2013). Dies erlaubt die Aktivierung von Slack durch den lokalen Anstieg der  $[\text{Na}^+]_i$  während exzitatorischer Erregung. Darüber hinaus wurde für Slack eine Beteiligung an der Nachhyperpolarisation gezeigt. Aufgrund der etwas verzögerten Öffnungsgeschwindigkeit tragen Slack-Kanäle im Gegensatz zu BK-Kanälen jedoch zur langsamen AHP (sAHP) bei (Kaczmarek 2013). Demnach könnte Slack, ähnlich wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{K}_{\text{Ca}2}$ - und BK-Kanäle, im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus infolge des Anstiegs der  $[\text{Na}^+]_i$  aktiviert werden und durch die Hyperpolarisation der Membran zur Terminierung der Aktivität von beispielsweise spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen führen. Diese Hypothese wird durch die im Rahmen dieser Arbeit akquirierten Ergebnisse unterstützt. In *in vivo* und *in vitro* Exzitotoxizitätsstudien konnte aufgezeigt werden, dass die Deletion des Slack-Kanals mit einer vermehrten exzitotoxischen Schädigung einhergeht. Allerdings wurde noch nicht abschließend geklärt, welche zellulären Mechanismen für die Slack-medierte Neuroprotektion verantwortlich sind.

Aufgrund der vorliegenden Befunde kann jedoch hypothetisiert werden, dass es im Rahmen der NMDA-induzierten Exzitotoxizität zur Slack-abhängigen Regulation der Gentranskription über bislang unbekannte Mechanismen kommt. So zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit eine vermehrte TrkB-mRNA-Expression sowie eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK in WT CGCs. Dies führt zur Hypothese, dass es durch die Slack-abhängige Regulation der aktivitätsabhängigen Genexpression zu einer gesteigerten Aktivierung des BDNF-TrkB-Signalwegs und nachfolgend zur vermehrten Aktivierung der neuroprotektiven ERK-Signalkaskade kommt, wodurch die beobachtete Neuroprotektion in WT CGCs erklärt werden könnte (siehe Abbildung 5.1). Weiter protektive Mechanismen sind natürlich möglich und sollen Gegenstand zukünftiger Studien sein. Solche Protektionsmechanismen lassen sich z. B. wie oben beschrieben von Studien zu andern  $\text{K}^+$ -Kanälen ableiten und umfassen

u. a. die Nachhyperpolarisation („Notbremse“) sowie die mitochondriale Expression des Kanals.



#### **Abbildung 5.1: Hypothese - Neuroprotektiver Einfluss des Slack-Kanals bei Exzitotoxizität**

Im Rahmen exzitotoxischer Prozesse ist eine Slack-Aktivierung infolge des Anstiegs der  $[Na^+]_i$  denkbar. Infolge einer solchen Slack-Kanalaktivität kommt es, über noch unbekannte Mechanismen, zu einer Hochregulation der BDNF-mRNA-Expression sowie selektiv in WT-CGCs zu gesteigerten TrkB-mRNA-Leveln. Denkbar wäre, dass die infolge der Slack-Kanalaktivität induzierte Dissoziation von Phactr1 und die daraus resultierende Inhibition von PP1 durch verminderte Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression neuroprotektiver Faktoren stimuliert. Die unterschiedliche Hochregulation von BDNF- und v. a. TrkB-mRNA führt in WT im Vergleich zu Slack-KO Neuronen zu einem gesteigerten BDNF-TrkB-Signalling und dadurch bedingt zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK. Die Aktivierung des ERK-Signalwegs triggert über verschiedene regulatorische Mechanismen eine Neuroprotektion. Bislang konnten jedoch keine genotypabhängigen Unterschiede in der Phosphorylierung von CREB festgestellt werden, weshalb eine selektiv im WT hochregulierte CREB-induzierte Genexpression neurotropher Faktoren vermutlich ausgeschlossen werden kann. Genotypspezifische Einflüsse auf die Proteinexpression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 wurden bislang noch nicht untersucht.

#### **5.4 Limitationen der durchgeführten Experimente und Ausblick**

Trotz der interessanten Befunde, die sich von den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien ableiten lassen, bleiben noch einige Fragen offen. So konnte nicht vollständig geklärt werden, über welche regulatorischen Mechanismen die Slack-abhängige Neuroprotektion vermittelt wird. Wie zuvor diskutiert liefern, die in Kapitel 4 dargestellten Daten einen Hinweis darauf, dass es infolge der NMDA-induzierten Exzitotoxizität und dem dadurch bedingten  $[Na^+]_i$ -Anstieg zur Aktivierung von Slack-Kanälen kommt. Des Weiteren deuten sie daraufhin, dass Slack das Ausmaß neuronaler Schädigung während exzitotoxischer Neuronenaktivität limitieren kann. Jedoch konnte der Einfluss der

Slack-Kanalaktivität auf nachgeschaltete Prozesse, wie die Hyperpolarisation der Membran oder die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden bisher noch nicht eindeutig entschlüsselt werden. Um diese Fragestellungen weiter aufzuklären sind u. a. elektrophysiologische Messungen an kultivierten CGCs von WT und Slack-KO Tieren von großem Interesse. Durch Bestimmung der Slack-Kanalaktivität unter Ruhebedingungen sowie nach NMDA-Stimulation könnte geklärt werden ob es während der exzitotoxischen Stimulation tatsächlich zur Aktivierung von Slack-Kanälen in WT CGCs kommt. Auch könnte untersucht werden, welchen Beitrag Slack-Kanäle an der Hyperpolarisation haben und welche Unterschiede in der Aktivität nachgeschalteter spannungsabhängiger Ionenkanäle zwischen WT und Slack-KO CGC-Kulturen bestehen. Daneben könnten durch die Verwendung spezifischer, genetisch kodierter, Fluorophor-gekoppelter Kaliumsensoren (*genetically encoded potassium ion indicators* (GEPiIs)) Änderungen der extra sowie intrazellulären Kaliumkonzentration detektiert werden (Bischof et al. 2017). So könnte mit Hilfe der GEPiI-Sensoren indirekt die Slack-Kanalaktivität nach NMDA-Applikation bewiesen werden. Dabei widerspiegelt die Differenz aus der extrazellulären  $K^+$ -Ionenkonzentration von WT und Slack-KOs nach NMDA-Applikation den Anteil an  $K^+$  der durch Slack-Kanäle ausströmt.

Aufgrund der ausschließlich für Slack-KO CGCs beobachteten reduzierten mRNA-Transkript-Level nach NMDA-Stimulation wird ein Zusammenhang zwischen der Slack-Aktivität und der Transkription vermutet. Eindeutige Belege hierfür stehen jedoch aus. Ein möglicher experimenteller Ansatzpunkt um diese Hypothese zu untermauern, wäre die Durchführung der NMDA-Exzitotoxizitätsstudien in Kombination mit einem Transkriptioninhibitor wie z. B. Actinomycin C (Strohm et al. 2002). Die Inhibierung der RNA-Synthese müsste in den WT CGCs zu einer Reduktion der zuvor erhöhten Genexpression führen. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Überprüfung der Rolle von Slack-Kanälen während der RNA-Synthese wäre die gezielte Blockade der Kanäle. Leider sind die derzeit verfügbaren Slack-Kanalantagonisten nicht sehr spezifisch. So hemmen Substanzen wie Bepiridil, Chinidin (Bhattacharjee et al. 2003, Yang et al. 2006) und Clofilium (Gessner und Heinemann 2003, de Los Angeles Tejada et al. 2012) auch andere unspezifischen Ionenkanäle sowie  $K^+$ -Ionenkanäle wie hERG, hEAG, Kv1.5-Kanal, Slick oder Slo3. In der Masterarbeit von M. Sc. Pharm. Nadine Frank, welche parallel zur vorliegenden Doktorarbeit angefertigt wurde, wurden die genannten Inhibitoren im cerebellären *in vitro* Exzitotoxizitätsmodell getestet. Dabei konnten zumindest in Bezug auf das neuronale Überleben der WT CGCs keine spezifische Veränderung nach Zugabe der Inhibitoren nachgewiesen werden (Frank 2016). Demnach scheinen diese Inhibitoren für eine solche Untersuchung ungeeignet. Eine weitere Limitation ist, dass bislang beobachtete Expressionsunterschiede von beispielsweise pro- und anti apoptotischen Faktoren sowie von TrkB und TrkC zwischen WT und Slack-KO CGCs ausschließlich auf mRNA-Ebene



analysiert wurden. Einzig die Regulation der PI3K-/MAPK-Signalwege, welche in der Phosphorylierung von Akt und ERK resultiert, wurden auf Proteinebene untersucht. Die aufgezeigten genotypspezifischen Unterschiede in den Phospho-Erk-Leveln lassen zwar vermuten, dass sich die mRNA-Expressionsunterschiede von TrkB auch auf die Proteinebene, und somit die Expression der TrkB-Rezeptoren auswirken, jedoch wurde dies noch nicht abschließend geklärt. Hierfür müssten die Slack-abhängigen Expressionsunterschiede von u. a. den Tyrosinkinase-Rezeptoren durch WB-Analyse oder IHC-/IF-Färbung mit spezifischen Antikörpern verifiziert werden. Die Beteiligung von Phospho-ERK im Rahmen der Slack-vermittelten Neuroprotektion könnte durch die gezielte Blockade dieser Kinase mit beispielsweise PD98059 (Kim et al. 2011) weiter untersucht werden.

Neben den exzitotoxischen Studien an primären Neuronenkulturen können solche Untersuchungen auch an organotypischen Schnittkulturen des Gehirns (Zimmer et al. 2000, Humpel 2015) bzw. des Cerebellums (Meldrum 2000) oder Hippocampus (Noraberg et al. 2005, Wang und Andreasson 2010) durchgeführt werden. Der Vorteil dabei ist, dass es sich um 3-dimensionale Modellsysteme handelt bei denen die Zellen nicht aus dem Gewebeverband herausgelöst werden und dadurch viele synaptische Verbindungen noch intakt sind. Exzitotoxische Untersuchungen an solchen organotypischen Primärkulturen wären demzufolge nicht nur auf einen isolierten Neuronentyp limitiert. Vielmehr berücksichtigt ein solches Primärkultursystem neuronale, astrozytäre und mikrogliale Einflüsse auf z. B. das Zellüberleben. Da es sich aber dennoch um ein *ex vivo* System handelt spielen Faktoren wie die Durchblutung des Gewebes oder die Rekrutierung inflammatorischer Zellen keine Rolle (Wang und Andreasson 2010).

## 6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit ist die Aufklärung der neuroprotektiven Wirkung des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack unter exzitotoxischen Bedingungen. Dieser Zusammenhang wurde sowohl in einem *in vivo* Mausmodell als auch in *in vitro* Kulturen primärer Granularzellen untersucht. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit einerseits ein Modell zur intrastriatalen NMDA-Injektion (siehe 3.4) und andererseits ein Primärzellkultursystem cerebellärer Granularzellen (siehe 3.5) etabliert. Die Expression des Slack-Kanals im Striatum sowie in cerebellären Granularzellen war vor Beginn der Arbeit nur teilweise bekannt (Bausch et al. 2015, Rizzi et al. 2016), außerdem wurden die Slack-Nachweise bis dato ohne Einbeziehen einer geeigneten Slack-KO Kontrolle durchgeführt. Die Expression der Slack-Kanäle im Striatum sowie in kultivierten cerebellären Granularzellen wurde im Verlauf dieser Doktorarbeit erstmals mittels immunhistochemischen und Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 4.1.1 und 4.2.2) gezeigt und die Spezifität der verwendeten Antikörper durch Parallelfärbungen von *Knockout*-Gewebe bzw. *Knockout*-Zellen demonstriert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen neuroprotektiven Effekt des Slack-Kanals während Glutamaterezeptor-vermittelter Exzitotoxizität sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. So verursachen intrastriatale NMDA-Mikroinjektionen in Slack-defizienten Tieren signifikant größere Hirnläsionen als in WT Mäusen (siehe 4.1.2). Um mechanistische Aspekte der Slack-vermittelten Neuroprotektion im Rahmen exzitotoxischer Schädigung aufzudecken, wurden verschiedene Exzitotoxizitätsstudien an den *in vitro* CGC-Kulturen durchgeführt (siehe 4.3). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Glutamat-induzierte exzitotoxische Schädigung in kultivierten cerebellären Granularzellen hauptsächlich über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (siehe 4.3.2). Interessanterweise blieb der genotypabhängige Unterschied auch nach AMPA-Rezeptorblockade bestehen. Dies war überraschend, da bislang nur ein Zusammenhang zwischen Slack und AMPA-Rezeptoren bekannt war (Nanou und El Manira 2007). Nanou und Kollegen postulierten, dass der Na<sup>+</sup>-Influx durch AMPA-Rezeptoren zur Aktivierung Na<sup>+</sup>-aktivierter K<sup>+</sup>-Kanäle führt. Im Sinne eines negativ-gekoppelten Feedbackmechanismus kommt es so zur Repolarisation und damit zur Reduktion AMPA-abhängiger postsynaptischer Potentiale in Anwesenheit von Slack-Kanälen (Nanou und El Manira 2007, Nanou et al. 2008). Eine funktionelle Kopplung zwischen NMDA-Rezeptoren und Slack wurde bisher nicht beobachtet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten damit erstmalig daraufhin, dass Slack auch nach NMDA-Rezeptorstimulation aktiviert wird. Der von Nanou et al. beschriebene Feedback-Mechanismus wäre eine Erklärungsmöglichkeit für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Slack-abhängige Neuroprotektion während NMDA-Rezeptorstimulation.

Elektrophysiologische Messungen zum direkten Nachweis der Induktion von  $K^+$ -Strömen nach NMDA-Rezeptoraktivierung stehen jedoch noch aus. Darüber hinaus konnten im Verlauf dieser Arbeit in WT und Slack-KO CGC-Kulturen Unterschiede in der NMDA-induzierten Gentranskription detektiert werden. Dabei wurden exemplarisch Gene, die potentiell an der Slack-vermittelten Neuroprotektion beteiligt sein könnten, ausgewählt und untersucht. Dennoch zeigt sich ein Trend, dass nach NMDA-Stimulation verschiedene Gene im WT stärker induziert werden als im Slack-KO. So wurde eine Slack-abhängige Regulation der mRNA-Transkripte des ebenfalls zur Slo-Kaliumkanalfamilie zählenden BK-Kanals nach exzitotoxischer NMDA-Stimulation aufgedeckt. Des Weiteren scheint die Slack-Deletion die Transkription von Vertretern der Bcl-2-Familie zu beeinflussen. Nach NMDA-Exzitotoxizität konnten zumindest teilweise, selektiv erhöhte mRNA-Level der pro- und antiapoptotischen Faktoren Bad, Bax, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 festgestellt werden. Der wohl interessanteste Befund der Slack-abhängigen Genexpressionsanalyse war die stark erhöhte Hochregulation der Tyrosinkinase-Rezeptoren in WT CGCs, während in Slack-KO Kulturen keine Änderung der Expressionslevel nach NMDA-Stimulation nachgewiesen werden konnte. Die im Slack-KO veränderte Gentranskription neuroprotektiver Gene könnte zumindest teilweise ursächlich für die detektierten Unterschiede in der exzitotoxischen Schädigung sein. Entsprechend könnte die verminderte Empfindlichkeit der WT Neurone gegenüber den exzitotoxischen Stimuli auf einer gesteigerten Aktivierung von Trk-Rezeptor-nachgeschalteten Signalwegen beruhen. In diesen Kontext fügen sich auch die Ergebnisse der Untersuchung der neuroprotektiven Akt- und ERK-Signalwege ein. Auch auf dieser Ebene konnte eine genotypspezifische Änderung der Phosphorylierungslevel von ERK, die auf eine Aktivierung dieser Signalkaskade in WT CGCs hindeutet, aufgezeigt werden.

Die therapeutischen Maßnahmen zur Protektion neuronaler Strukturen während z. B. cerebraler Ischämie oder im Verlauf des Alterungsprozesses sind derzeit noch sehr begrenzt. Es fehlen spezifische Behandlungsstrategien, welche nach akuten Gehirnverletzungen aber auch im Verlauf chronischer Schädigung die Neuronendegeneration limitieren können. Aufgrund der hauptsächlich neuronalen Expression des  $Na^+$ -aktivierten  $K^+$ -Kanals Slack ist dieser als möglicher Ansatzpunkt für eine gezielte Intervention im Rahmen neuronenschädigender Prozesse interessant.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine neuroprotektive Funktion des Slack-Kanals bestätigen. Anhand der vorliegenden Befunde kann keine endgültige Aussage über die zugrundeliegenden Mechanismen gemacht werden. Jedoch kann postuliert werden, dass Slack seine neuroprotektiven Effekte durch Beeinflussung der Expression neurotropher Faktoren sowie der korrespondierenden Rezeptoren und die dadurch bedingte gesteigerte Aktivierung des pro-survival Signalwegs ERK vermittelt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adelman, J. P., Maylie, J. and Sah, P. (2012). "Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: form and function." Annu Rev Physiol **74**: 245-269.
- Adelman, J. P., Shen, K.-Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., Wu, Y.-N., Lagrutta, A., Bond, C. T. and Alan North, R. (1992). "Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs." Neuron **9**(2): 209-216.
- Alagarsamy, S., Rouse, S. T., Gereau, R. W., Heinemann, S. F., Smith, Y. and Conn, P. J. (1999). "Activation of N - Methyl - D - Aspartate Receptors Reverses Desensitization of Metabotropic Glutamate Receptor, mGluR5, in Native and Recombinant Systems." Annals of the New York Academy of Sciences **868**(1): 526-530.
- Albensi, B. C., Igoechi, C., Janigro, D. and Ilkanich, E. (2004). "Why do many NMDA antagonists fail, while others are safe and effective at blocking excitotoxicity associated with dementia and acute injury?" American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias **19**(5): 269-274.
- Albers, G. W., Clark, W. M., Atkinson, R. P., Madden, K., Data, J. L. and Whitehouse, M. J. (1999). "Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke." Stroke **30**(3): 508-513.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Alessi, D. R. and Cohen, P. (1998). "Mechanism of activation and function of protein kinase B." Current Opinion in Genetics & Development **8**(1): 55-62.
- Ali, C., Nicole, O., Docagne, F., Lesne, S., MacKenzie, E. T., Nouvelot, A., Buisson, A. and Vivien, D. (2000). "Ischemia-Induced Interleukin-6 as a Potential Endogenous Neuroprotective Cytokine against NMDA Receptor-Mediated Excitotoxicity in the Brain." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **20**(6): 956-966.
- Allen, D., Nakayama, S., Kuroiwa, M., Nakano, T., Palmateer, J., Kosaka, Y., Ballesteros, C., Watanabe, M., Bond, C. T., Lujan, R., Maylie, J., Adelman, J. P. and Herson, P. S. (2011). "SK2 channels are neuroprotective for ischemia-induced neuronal cell death." J Cereb Blood Flow Metab **31**(12): 2302-2312.
- Allen, P. B., Greenfield, A. T., Svenningsson, P., Haspelagh, D. C. and Greengard, P. (2004). "Phactrs 1–4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(18): 7187-7192.
- Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. V., Gomes, J. R., Mendes, C. S., Grãos, M. M., Carvalho, R. F., Carvalho, A. P. and Duarte, C. B. (2005). "Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways." Cell Death And Differentiation **12**: 1329.
- Aminkeng, F. (2012). "KCNT1 mutations in ADNFLE and MMPSI: a new driver in the etiology and pathophysiology of early-onset epileptic syndromes." Clin Genet **83**(4): 319-320.
- Anderson, C. M. and Swanson, R. A. (2000). "Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions." Glia **32**(1): 1-14.

- Andreu-Fernández, V., Sancho, M., Genovés, A., Lucendo, E., Todt, F., Lauterwasser, J., Funk, K., Jahreis, G., Pérez-Payá, E., Mingarro, I., Edlich, F. and Orzáez, M. (2017). "Bax transmembrane domain interacts with prosurvival Bcl-2 proteins in biological membranes." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(2): 310-315.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. and Nicotera, P. (1995). "Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." Neuron **15**(4): 961-973.
- Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C. and Bassell, G. J. (2004). "Metabotropic Glutamate Receptor Activation Regulates Fragile X Mental Retardation Protein and *Fmr1* mRNA Localization Differentially in Dendrites and at Synapses." The Journal of Neuroscience **24**(11): 2648-2655.
- Antar, L. N. and Bassell, G. J. (2003). "Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface." Neuron **37**(4): 555-558.
- Aon, M. A., Cortassa, S., Wei, A.-C., Grunnet, M. and O'Rourke, B. (2010). "Energetic performance is improved by specific activation of K<sup>+</sup> fluxes through KCa channels in heart mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(1): 71-80.
- Arai-Ichinoi, N., Uematsu, M., Sato, R., Suzuki, T., Kudo, H., Kikuchi, A., Hino-Fukuyo, N., Matsumoto, M., Igarashi, K., Haginoya, K. and Kure, S. (2015). "Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy." Hum Genet.
- Arai-Ichinoi, N., Uematsu, M., Sato, R., Suzuki, T., Kudo, H., Kikuchi, A., Hino-Fukuyo, N., Matsumoto, M., Igarashi, K., Haginoya, K. and Kure, S. (2016). "Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy." Hum Genet **135**(1): 89-98.
- Araque, A. and Navarrete, M. (2010). "Glial cells in neuronal network function." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **365**(1551): 2375-2381.
- Armstrong, N. and Gouaux, E. (2000). "Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core." Neuron **28**(1): 165-181.
- Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M. and Gouaux, E. (2006). "Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor." Cell **127**(1): 85-97.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q. and Gouaux, E. (1998). "Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate." Nature **395**(6705): 913-917.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(8): 4155-4160.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1994). "Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex." J Neurosci **14**(9): 5559-5569.
- Arundine, M. and Tymianski, M. (2003). "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity." Cell Calcium **34**(4): 325-337.

- Ascher, P. and Nowak, L. (1988). "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture." J Physiol **399**: 247-266.
- Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D. and Warren, S. T. (1993). "FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding." Science **262**(5133): 563-566.
- Atkinson, N., Robertson, G. and Ganetzky, B. (1991). "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus." Science **253**(5019): 551-555.
- Attwell, D. (2000). "Brain Uptake of Glutamate: Food for Thought." The Journal of Nutrition **130**(4): 1023S-1025S.
- Ayalon, G. and Stern-Bach, Y. (2001). "Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions." Neuron **31**(1): 103-113.
- Ayata, C., Ayata, G., Hara, H., Matthews, R. T., Beal, M. F., Ferrante, R. J., Endres, M., Kim, A., Christie, R. H., Waeber, C., Huang, P. L., Hyman, B. T. and Moskowitz, M. A. (1997). "Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice." J Neurosci **17**(18): 6908-6917.
- Bader, C. R., Bernheim, L. and Bertrand, D. (1985). "Sodium-activated potassium current in cultured avian neurones." Nature **317**: 540.
- Balázs, R., Hack, N., Jørgensen, O. S. and Cotman, C. W. (1989). "N-Methyl-d-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells: Pharmacological characterization." Neuroscience Letters **101**(3): 241-246.
- Bamji, S. X., Majdan, M., Pozniak, C. D., Belliveau, D. J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C. G. and Miller, F. D. (1998). "The p75 Neurotrophin Receptor Mediates Neuronal Apoptosis and Is Essential for Naturally Occurring Sympathetic Neuron Death." The Journal of Cell Biology **140**(4): 911-923.
- Banke, T. G. and Traynelis, S. F. (2003). "Activation of NR1/NR2B NMDA receptors." Nat Neurosci **6**(2): 144-152.
- Bar-Am, O., Weinreb, O., Amit, T. and Youdim, M. B. H. (2005). "Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine." The FASEB Journal **19**(13): 1899-1901.
- Barbin, G., Manthorpe, M. and Varon, S. (1984). "Purification of the Chick Eye Ciliary Neurotrophic Factor." Journal of Neurochemistry **43**(5): 1468-1478.
- Barcia, G., Fleming, M. R., Deligniere, A., Gazula, V. R., Brown, M. R., Langouet, M., Chen, H., Kronengold, J., Abhyankar, A., Cilio, R., Nitschke, P., Kaminska, A., Boddaert, N., Casanova, J. L., Desguerre, I., Munnich, A., Dulac, O., Kaczmarek, L. K., Colleaux, L. and Nabbout, R. (2012). "De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy." Nat Genet **44**(11): 1255-1259.
- Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y. and Mandel, J. L. (1997). "Analysis of Domains Affecting Intracellular Localization of the FMRP Protein." Neurobiology of Disease **4**(5): 329-336.
- Barry, M. F. and Ziff, E. B. (2002). "Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses." Curr Opin Neurobiol **12**(3): 279-286.

- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. and Julius, D. (2009). "Cellular and Molecular Mechanisms of Pain." Cell **139**(2): 267-284.
- Bassell, G. J. and Warren, S. T. (2008). "Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function." Neuron **60**(2): 201-214.
- Bausch, A. E., Dieter, R., Nann, Y., Hausmann, M., Meyerdierks, N., Kaczmarek, L. K., Ruth, P. and Lukowski, R. (2015). "The sodium-activated potassium channel Slack is required for optimal cognitive flexibility in mice." Learning & Memory **22**(7): 323-335.
- Bausch, A. E., Ehinger, R., Straubinger, J., Zeffass, P., Nann, Y. and Lukowski, R. (2018). "Loss of Sodium-Activated Potassium Channel Slack and FMRP Differentially Affect Social Behavior in Mice." Neuroscience **384**: 361-374.
- Bayir, H. and Kagan, V. E. (2008). "Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory." Crit Care **12**(1): 206.
- Beaman-Hall, C. M., Leahy, J. C., Benmansour, S. and Vallano, M. L. (1998). "Glia Modulate NMDA - Mediated Signaling in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells." Journal of Neurochemistry **71**(5): 1993-2005.
- Bear, M. F., Huber, K. M. and Warren, S. T. (2004). "The mGluR theory of fragile X mental retardation." Trends Neurosci **27**(7): 370-377.
- Bearden, D., Strong, A., Ehnot, J., DiGiovine, M., Dlugos, D. and Goldberg, E. M. (2014). "Targeted treatment of migrating partial seizures of infancy with quinidine." Ann Neurol **76**(3): 457-461.
- Beck, T., Lindholm, D., Castren, E. and Wree, A. (1994). "Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus." J Cereb Blood Flow Metab **14**(4): 689-692.
- Belmonte, M. K. and Bourgeron, T. (2006). "Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks." Nat Neurosci **9**(10): 1221-1225.
- Bennett, J. A. and Dingledine, R. (1995). "Topology profile for a glutamate receptor: Three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop." Neuron **14**(2): 373-384.
- Bentzen, B. H., Olesen, S.-P., Rønn, L. C. B. and Grunnet, M. (2014). "BK channel activators and their therapeutic perspectives." Frontiers in Physiology **5**(389).
- Berg, A. P., Sen, N. and Bayliss, D. A. (2007). "TrpC3/C7 and Slo2.1 Are Molecular Targets for Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Rat Striatal Cholinergic Interneurons." The Journal of Neuroscience **27**(33): 8845-8856.
- Berry-Kravis, E. (2002). "Epilepsy in fragile X syndrome." Dev Med Child Neurol **44**(11): 724-728.
- Bessho, Y., Nawa, H. and Nakanishi, S. (1994). "Selective up-regulation of an nmda receptor subunit mrna in cultured cerebellar granule cells by K<sup>+</sup>-induced depolarization and nmda treatment." Neuron **12**(1): 87-95.

- Beyers, M. B., Lawrence, E., Maronski, M., Starr, N., Amesquita, M. and Neumar, R. W. (2009). "Knockdown of m-calpain increases survival of primary hippocampal neurons following NMDA excitotoxicity." Journal of Neurochemistry **108**(5): 1237-1250.
- Bhattacharjee, A., Gan, L. and Kaczmarek, L. K. (2002). "Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system." J Comp Neurol **454**(3): 241-254.
- Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J. and Kaczmarek, L. K. (2003). "Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP." J Neurosci **23**(37): 11681-11691.
- Bhattacharjee, A. and Kaczmarek, L. K. (2005). "For K<sup>+</sup> channels, Na<sup>+</sup> is the new Ca<sup>2+</sup>." Trends Neurosci **28**(8): 422-428.
- Bhattacharjee, A., von Hehn, C. A., Mei, X. and Kaczmarek, L. K. (2005). "Localization of the Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel Slick in the rat central nervous system." J Comp Neurol **484**(1): 80-92.
- Bilimoria, P. M. and Bonni, A. (2008). "Cultures of cerebellar granule neurons." CSH Protoc **2008**: pdb.prot5107.
- Billen, L. P., Kokoski, C. L., Lovell, J. F., Leber, B. and Andrews, D. W. (2008). "Bcl-XL Inhibits Membrane Permeabilization by Competing with Bax." PLOS Biology **6**(6): e147.
- Bischof, H., Rehberg, M., Stryeck, S., Artinger, K., Eroglu, E., Waldeck-Weiermair, M., Gottschalk, B., Rost, R., Deak, A. T., Niedrist, T., Vujic, N., Lindermuth, H., Prassl, R., Pelzmann, B., Groschner, K., Kratky, D., Eller, K., Rosenkranz, A. R., Madl, T., Plesnila, N., Graier, W. F. and Malli, R. (2017). "Novel genetically encoded fluorescent probes enable real-time detection of potassium in vitro and in vivo." Nature Communications **8**(1): 1422.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Boche, D., Cunningham, C., Gauldie, J. and Perry, V. H. (2003). "Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Mediated Neuroprotection against Excitotoxic Injury in Vivo." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **23**(10): 1174-1182.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. and Lipton, S. A. (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(16): 7162-7166.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A. and Greenberg, M. E. (1999). "Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms." Science **286**(5443): 1358-1362.
- Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E., Maron, C. and Heinemann, S. (1990). "Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes." Science **249**(4972): 1033-1037.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Braithwaite, S. P., Meyer, G. and Henley, J. M. (2000). "Interactions between AMPA receptors and intracellular proteins." Neuropharmacology **39**(6): 919-930.



- Brandoli, C., Sanna, A., De Bernardi, M. A., Follesa, P., Brooker, G. and Mocchetti, I. (1998). "Brain-Derived Neurotrophic Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Downregulate NMDA Receptor Function in Cerebellar Granule Cells." The Journal of Neuroscience **18**(19): 7953-7961.
- Brenner, R., Chen, Q. H., Vilaythong, A., Toney, G. M., Noebels, J. L. and Aldrich, R. W. (2005). "BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures." Nat Neurosci **8**(12): 1752-1759.
- Brown, D. R. (1999). "Neurons Depend on Astrocytes in a Coculture System for Protection from Glutamate Toxicity." Molecular and Cellular Neuroscience **13**(5): 379-389.
- Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V. R., Chen, Y., Strumbos, J. G., Sigworth, F. J., Navaratnam, D. and Kaczmarek, L. K. (2010). "Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack." Nat Neurosci **13**(7): 819-821
- Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V. R., Spilianakis, C. G., Flavell, R. A., von Hehn, C. A., Bhattacharjee, A. and Kaczmarek, L. K. (2008). "Amino-terminal isoforms of the Slack K<sup>+</sup> channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation." J Physiol.
- Brugge, J., Hung, M. C. and Mills, G. B. (2007). "A new mutational AKTivation in the PI3K pathway." Cancer Cell **12**(2): 104-107.
- Buckingham, S. D., Kidd, J. F., Law, R. J., Franks, C. J. and Sattelle, D. B. (2005). "Structure and function of two-pore-domain K<sup>+</sup> channels: contributions from genetic model organisms." Trends Pharmacol Sci **26**(7): 361-367.
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A. and Salkoff, L. (1993). "mSlo, a Complex Mouse Gene Encoding "Maxi" Calcium-Activated Potassium Channels." Science **261**(5118): 221-224.
- Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L. and Duarte, C. B. (2007). "BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons." Mol Cell Neurosci **35**(2): 208-219.
- Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J. and Sheils, O. M. (2011). "BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy." Mol Cancer Ther **10**(3): 385-394.
- Carafoli, E. (1991). "Calcium pump of the plasma membrane." Physiol Rev **71**(1): 129-153.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science **282**(5392): 1318-1321.
- Carranza Rojo, D., Hamiwka, L., McMahon, J. M., Dibbens, L. M., Arsov, T., Suls, A., Stodberg, T., Kelley, K., Wirrell, E., Appleton, B., Mackay, M., Freeman, J. L., Yendle, S. C., Berkovic, S. F., Bienvu, T., De Jonghe, P., Thorburn, D. R., Mulley, J. C., Mefford, H. C. and Scheffer, I. E. (2011). "De novo SCN1A mutations in migrating partial seizures of infancy." Neurology **77**(4): 380-383.
- Cartmell, J. and Schoepp, D. D. (2000). "Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors." J Neurochem **75**(3): 889-907.

Castilho, R. F., Ward, M. W. and Nicholls, D. G. (1999). "Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Acute Glutamate Excitotoxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells." Journal of Neurochemistry **72**(4): 1394-1401.

Cerminara, N. L., Lang, E. J., Sillitoe, R. V. and Apps, R. (2015). "Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits." Nature Reviews Neuroscience **16**: 79.

Chan, F. K.-M., Moriwaki, K. and De Rosa, M. J. (2013). "Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **979**: 65-70.

Chao, M. V. (1994). "The p75 neurotrophin receptor." J Neurobiol **25**(11): 1373-1385.

Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A. and Zhang, D. (2002). "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits." Nature **415**(6873): 793-798.

Chen, E., Sharma, M. R., Shi, X., Agrawal, R. K. and Joseph, S. (2014). "Fragile X Mental Retardation Protein Regulates Translation by Binding Directly to the Ribosome." Molecular cell **54**(3): 407-417.

Chen, H., Kronengold, J., Yan, Y., Gazula, V. R., Brown, M. R., Ma, L., Ferreira, G., Yang, Y., Bhattacharjee, A., Sigworth, F. J., Salkoff, L. and Kaczmarek, L. K. (2009). "The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels." J Neurosci **29**(17): 5654-5665.

Cheng, B. and Mattson, M. P. (1994). "NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults." Brain Research **640**(1): 56-67.

Choi, D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." Neuron **1**(8): 623-634.

Choi, D. W. (1992). "Excitotoxic cell death." Journal of Neurobiology **23**(9): 1261-1276.

Choi, D. W. (1994). Chapter 6 Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. Progress in Brain Research. F. E. Bloom, Elsevier. **100**: 47-51.

Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. and Kriegstein, A. R. (1987). "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture." J Neurosci **7**(2): 357-368.

Christie, S. B., Akins, M. R., Schwob, J. E. and Fallon, J. R. (2009). "The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits." J Neurosci **29**(5): 1514-1524.

Churchwell, K. B., Wright, S. H., Emma, F., Rosenberg, P. A. and Strange, K. (1996). "NMDA Receptor Activation Inhibits Neuronal Volume Regulation after Swelling Induced by Veratridine-Stimulated Na<sup>+</sup> Influx in Rat Cortical Cultures." The Journal of Neuroscience **16**(23): 7447-7457.

- Coderre, T. J., Katz, J., Vaccarino, A. L. and Melzack, R. (1993). "Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence." *Pain* **52**(3): 259-285.
- Conn, P. J. and Pin, J. P. (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 205-237.
- Constantine-Paton, M. (1990). "NMDA receptor as a mediator of activity-dependent synaptogenesis in the developing brain." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**: 431-443.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." *Cerebellum* **1**(1): 41-55.
- Coppola, G., Plouin, P., Chiron, C., Robain, O. and Dulac, O. (1995). "Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest." *Epilepsia* **36**(10): 1017-1024.
- Corbin, F., Bouillon, M., Fortin, A., Morin, S., Rousseau, F. and Khandjian, E. W. (1997). "The Fragile X Mental Retardation Protein is Associated with Poly(A)<sup>+</sup> mRNA in Actively Translating Polyribosomes." *Human Molecular Genetics* **6**(9): 1465-1472.
- Costa, A. D. and Garlid, K. D. (2008). "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(2): H874-882.
- Costabile, V., Duraturo, F., Delrio, P., Rega, D., Pace, U., Liccardo, R., Rossi, G. B., Genesio, R., Nitsch, L., Izzo, P. and De Rosa, M. (2015). "Lithium chloride induces mesenchymal-to-epithelial reverting transition in primary colon cancer cell cultures." *Int J Oncol* **46**(5): 1913-1923.
- Cotman, C. W. and Berchtold, N. C. (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity." *Trends in Neurosciences* **25**(6): 295-301.
- Coyle, J. T., Molliver, M. E. and Kuhar, M. J. (1978). "In situ injection of kainic acid: A new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of passage." *The Journal of Comparative Neurology* **180**(2): 301-323.
- Coyle, J. T., Zaczek, R., Slevin, J. and Collins, J. (1981). "Neuronal receptor sites for kainic acid: correlations with neurotoxicity." *Adv Biochem Psychopharmacol* **27**: 337-346.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. and Farrant, M. (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." *Curr Opin Neurobiol* **11**(3): 327-335.
- D'Mello, S. R., Galli, C., Ciotti, T. and Calissano, P. (1993). "Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(23): 10989-10993.
- Daikhin, Y. and Yudkoff, M. (2000). "Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia." *The Journal of Nutrition* **130**(4): 1026S-1031S.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105.
- Danbolt, N. C., Pines, G. and Kanner, B. I. (1990). "Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate transport glycoprotein from rat brain." *Biochemistry* **29**(28): 6734-6740.

- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A. and Nakanishi, N. (1998). "Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A." Nature **393**(6683): 377-381.
- Davis, S. M., Lees, K. R., Albers, G. W., Diener, H. C., Markabi, S., Karlsson, G. and Norris, J. (2000). "Selfotel in acute ischemic stroke : possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist." Stroke **31**(2): 347-354.
- Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996). "Nitric oxide neurotoxicity." Journal of Chemical Neuroanatomy **10**(3): 179-190.
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1991). "Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6368-6371.
- De Filippo, M. R., Rizzo, F., Marchese, G., Giurato, G., Nassa, G., Ravo, M., Tarallo, R., Pironti, E., Vecchi, M., Cricchiutti, G., Capizzi, G., Verrotti, A., Weisz, A. and Coppola, G. (2013). "Lack of pathogenic mutations in six patients with MMPSI." Epilepsy Research(0).
- de Los Angeles Tejada, M., Stolpe, K., Meinild, A. K. and Klaerke, D. A. (2012). "Clofilium inhibits Slick and Slack potassium channels." Biologics **6**: 465-470.
- Dehnes, Y., Chaudhry, F. A., Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm-Mathisen, J. and Danbolt, N. C. (1998). "The Glutamate Transporter EAAT4 in Rat Cerebellar Purkinje Cells: A Glutamate-Gated Chloride Channel Concentrated near the Synapse in Parts of the Dendritic Membrane Facing Astroglia." The Journal of Neuroscience **18**(10): 3606-3619.
- Deng, P. Y., Rotman, Z., Blundon, J. A., Cho, Y., Cui, J., Cavalli, V., Zakharenko, S. S. and Klyachko, V. A. (2013). "FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels." Neuron **77**(4): 696-711.
- Descalzo, V. F., Nowak, L. G., Brumberg, J. C., McCormick, D. A. and Sanchez-Vives, M. V. (2005). "Slow Adaptation in Fast-Spiking Neurons of Visual Cortex." Journal of Neurophysiology **93**(2): 1111-1118.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.
- Dingledine, R. and McBain, C. (1999). Three Classes of Ionotropic Glutamate Receptor. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. G. Siegel, B. Agranoff and R. Albers. Philadelphia, Lippincott-Raven. **6th edition**.
- Doble, A. (1999). "The Role of Excitotoxicity in Neurodegenerative Disease: Implications for Therapy." Pharmacology & Therapeutics **81**(3): 163-221.
- Dolga, A. M. and Culmsee, C. (2012). "Protective Roles for Potassium SK/K(Ca)<sub>2</sub> Channels in Microglia and Neurons." Frontiers in Pharmacology **3**: 196.
- Dolga, A. M., Terpolilli, N., Kepura, F., Nijholt, I. M., Knaus, H. G., D'Orsi, B., Prehn, J. H. M., Eisel, U. L. M., Plant, T., Plesnila, N. and Culmsee, C. (2011). "KCa<sub>2</sub> channels activation prevents [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia." Cell Death & Disease **2**: e147.

- Dong, X. X., Wang, Y. and Qin, Z. H. (2009). "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases." Acta Pharmacol Sin **30**(4): 379-387.
- Dryer, S. E. (1991). "Na(+)-activated K<sup>+</sup> channels and voltage-evoked ionic currents in brain stem and parasympathetic neurones of the chick." The Journal of Physiology **435**: 513-532.
- Dryer, S. E. (1994). "Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a new family of large-conductance ion channels." Trends in Neurosciences **17**(4): 155-160.
- Dryer, S. E., Fujii, J. T. and Martin, A. R. (1989). "A Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in cultured brain stem neurones from chicks." The Journal of Physiology **410**: 283-296.
- Duan, S., Anderson, C. M., Stein, B. A. and Swanson, R. A. (1999). "Glutamate Induces Rapid Upregulation of Astrocyte Glutamate Transport and Cell-Surface Expression of GLAST." The Journal of Neuroscience **19**(23): 10193-10200.
- Dubin, A. E. and Patapoutian, A. (2010). "Nociceptors: the sensors of the pain pathway." The Journal of Clinical Investigation **120**(11): 3760-3772.
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E. (1997). "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt." Science **275**(5300): 661-665.
- Dugan, L., Sensi, S., Canzoniero, L., Handran, S., Rothman, S., Lin, T., Goldberg, M. and Choi, D. (1995). "Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate." The Journal of Neuroscience **15**(10): 6377-6388.
- Duke, R. C. and Cohen, J. J. (1986). "IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells." Lymphokine Res **5**(4): 289-299.
- Eaton, S. A., Jane, D. E., Jones, P. L., Porter, R. H., Pook, P. C., Sunter, D. C., Udvarhelyi, P. M., Roberts, P. J., Salt, T. E. and Watkins, J. C. (1993). "Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (S)-4-carboxyphenylglycine and (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine." Eur J Pharmacol **244**(2): 195-197.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y. and Warren, S. T. (1996). "The Fragile X Mental Retardation Protein is a Ribonucleoprotein Containing Both Nuclear Localization and Nuclear Export Signals." Human Molecular Genetics **5**(8): 1083-1091.
- Edfors, F., Danielsson, F., Hallström, B. M., Käll, L., Lundberg, E., Pontén, F., Forsström, B. and Uhlén, M. (2016). "Gene - specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues." Molecular Systems Biology **12**(10): 883.
- Egan, T. M., Dagan, D., Kupper, J. r. and Levitan, I. B. (1992). "Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are widely distributed in rat CNS and in *Xenopus* oocytes." Brain Research **584**(1): 319-321.
- Ehlers, M. D. (2000). "Reinsertion or Degradation of AMPA Receptors Determined by Activity-Dependent Endocytic Sorting." Neuron **28**(2): 511-525.
- Eide, F. F., Lowenstein, D. H. and Reichardt, L. F. (1993). "Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease." Exp Neurol **121**(2): 200-214.

- Eil, R., Vodnala, S. K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Sukumar, M., Pan, J. H., Palmer, D. C., Gros, A., Yamamoto, T. N., Patel, S. J., Guittard, G. C., Yu, Z., Carbonaro, V., Okkenhaug, K., Schrupp, D. S., Linehan, W. M., Roychoudhuri, R. and Restifo, N. P. (2016). "Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function." Nature **537**(7621): 539-543.
- Eliasof, S. and Werblin, F. (1993). "Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander." The Journal of Neuroscience **13**(1): 402-411.
- Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N. and Comella, J. X. (1999). "Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y." J Neurochem **73**(4): 1409-1421.
- Evely, K. M., Pryce, K. D. and Bhattacharjee, A. (2017). "The Phe932Ile mutation in KCNT1 channels associated with severe epilepsy, delayed myelination and leukoencephalopathy produces a loss-of-function channel phenotype." Neuroscience **351**: 65-70.
- Faber, E. S., Delaney, A. J. and Sah, P. (2005). "SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala." Nat Neurosci **8**(5): 635-641.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. and Amara, S. G. (1995). "An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel." Nature **375**(6532): 599-603.
- Fatokun, A. A., Smith, R. A. and Stone, T. W. (2008). "Resistance to kynurenic acid of the NMDA receptor-dependent toxicity of 3-nitropropionic acid and cyanide in cerebellar granule neurons." Brain Research **1215**: 200-207.
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulic, L. and Hemmings, B. A. (2011). Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease: Volume 1. C. Rommel, B. Vanhaesebroeck and P. K. Vogt. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 31-56.
- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D. E., Brown, V., Malter, H. E. and Warren, S. T. (1997). "FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association." Mol Cell **1**(1): 109-118.
- Ferraguti, F. and Shigemoto, R. (2006). "Metabotropic glutamate receptors." Cell Tissue Res **326**(2): 483-504.
- Ferron, L. (2016). "Fragile X mental retardation protein controls ion channel expression and activity." The Journal of Physiology **594**(20): 5861-5867.
- Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J. S. and Dolphin, A. C. (2014). "Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density." Nat Commun **5**: 3628.
- Figiel, I. (2008). "Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain." Acta Neurobiol Exp (Wars) **68**(4): 526-534.
- Fiorillo, C. D. and Williams, J. T. (1998). "Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons." Nature **394**(6688): 78-82.

- Fitzpatrick, M. and Hammond, L. (2014). "Cresyl Violet Staining (Nissl Staining)." from <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/misc/cresyl-violet-staining-nissl-staining.html>.
- Fleming, M. R., Brown, M. R., Kronengold, J., Zhang, Y., Jenkins, D. P., Barcia, G., Nabbout, R., Bausch, A. E., Ruth, P., Lukowski, R., Navaratnam, D. S. and Kaczmarek, L. K. (2016). "Stimulation of Slack K(+) Channels Alters Mass at the Plasma Membrane by Triggering Dissociation of a Phosphatase-Regulatory Complex." Cell Rep **16**(9): 2281-2288.
- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain." Journal of Neurochemistry **42**(1): 1-11.
- Franceschetti, S., Lavazza, T., Curia, G., Aracri, P., Panzica, F., Sancini, G., Avanzini, G. and Magistretti, J. (2003). "Na<sup>+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Current Contributes to Postexcitatory Hyperpolarization in Neocortical Intrinsically Bursting Neurons." Journal of Neurophysiology **89**(4): 2101-2111.
- Frandsen, A., Drejer, J. and Schousboe, A. (1989). "Direct Evidence That Excitotoxicity in Cultured Neurons Is Mediated via N - Methyl - D - Aspartate (NMDA) as well as Non - NMDA Receptors." Journal of Neurochemistry **53**(1): 297-299.
- Frank, N. (2016). "Einfluss des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack auf die exzitotoxische Schädigung von cerebellären Granularzellen." Master of Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Tübingen.
- Franklin, J. L. and Johnson, E. M. (1992). "Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium." Trends in Neurosciences **15**(12): 501-508.
- Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkert, A. J. M. H., Holden, J. J. A., Fenwick, R. G., Warren, S. T., Oostra, B. A., Nelson, D. L. and Caskey, C. T. (1991). "Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox." Cell **67**(6): 1047-1058.
- Fukunaga, K., Soderling, T. R. and Miyamoto, E. (1992). "Activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C by glutamate in cultured rat hippocampal neurons." J Biol Chem **267**(31): 22527-22533.
- Furukawa, H. and Gouaux, E. (2003). "Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core." Embo j **22**(12): 2873-2885.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. and Gouaux, E. (2005). "Subunit arrangement and function in NMDA receptors." Nature **438**(7065): 185-192.
- Gallo, V., Suergiu, R., Giovannini, C. and Levi, G. (1987). "Glutamate Receptor Subtypes in Cultured Cerebellar Neurons: Modulation of Glutamate and  $\gamma$  - Aminobutyric Acid Release." Journal of Neurochemistry **49**(6): 1801-1809.
- Gao, J., Siddoway, B., Huang, Q. and Xia, H. (2009). "Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase." Biochemical and Biophysical Research Communications **379**(1): 1-5.
- Garg, P. and Sanguinetti, M. C. (2014). "Intracellular ATP does not inhibit Slo2.1 K<sup>+</sup> channels."

Garthwaite, J. and Garthwaite, G. (1990). "Mechanisms of Excitatory Amino Acid Neurotoxicity in Rat Brain Slices" Excitatory Amino Acids and Neuronal Plasticity. Y. Ben-Ari. Boston, MA, Springer US: 505-518.

Gegelashvili, G., Danbolt, N. C. and Schousboe, A. (1997). "Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia." J Neurochem **69**(6): 2612-2615.

Gerges, N. Z., Backos, D. S. and Esteban, J. A. (2004). "Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family." J Biol Chem **279**(42): 43870-43878.

Gessner, G. and Heinemann, S. H. (2003). "Inhibition of hEAG1 and hERG1 potassium channels by clofilium and its tertiary analogue LY97241." Br J Pharmacol **138**(1): 161-171.

Ghosh, M., Yang, Y., Rothstein, J. D. and Robinson, M. B. (2011). "Nuclear Factor- $\kappa$ B Contributes to Neuron-Dependent Induction of Glutamate Transporter-1 Expression in Astrocytes." The Journal of Neuroscience **31**(25): 9159-9169.

Gillessen, T., Budd, S. L. and Lipton, S. A. (2002). "Excitatory amino acid neurotoxicity." Adv Exp Med Biol **513**: 3-40.

Gines, S., Paoletti, P. and Alberch, J. (2010). "Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in huntington disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression." J Biol Chem **285**(28): 21537-21548.

Glaum, S. R. and Miller, R. J. (1992). "Metabotropic glutamate receptors mediate excitatory transmission in the nucleus of the solitary tract." J Neurosci **12**(6): 2251-2258.

Goldberg, M. P. and Choi, D. W. (1993). "Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury." J Neurosci **13**(8): 3510-3524.

Goldstein, S. A. N., Wang, K.-W., Ilan, N. and Pausch, M. H. (1998). "Sequence and function of the two P domain potassium channels: implications of an emerging superfamily." Journal of Molecular Medicine **76**(1): 13-20.

Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia Ojeda, L., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D. and Latorre, R. (2012). "K<sup>+</sup> Channels: Function-Structural Overview."

Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M. and Thoenen, H. (1994). "Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family." Nature **372**(6503): 266-269.

Greger, I. H., Khatri, L., Kong, X. and Ziff, E. B. (2003). "AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing." Neuron **40**(4): 763-774.

Greger, I. H., Khatri, L. and Ziff, E. B. (2002). "RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum." Neuron **34**(5): 759-772.

Gribkoff, V. K., Starrett, J. E. and Dworetzky, S. I. (2001). "Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium." The Neuroscientist **7**(2): 166-177.



- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-1911.
- Grunnet, M., Jespersen, T., Angelo, K., Frokjaer-Jensen, C., Klaerke, D. A., Olesen, S. P. and Jensen, B. S. (2001). "Pharmacological modulation of SK3 channels." Neuropharmacology **40**(7): 879-887.
- Grunnet, M. and Kaufmann, W. A. (2004). "Coassembly of big conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in rat brain." J Biol Chem **279**(35): 36445-36453.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.
- Gunter, T. E., Gunter, K. K., Sheu, S. S. and Gavin, C. E. (1994). "Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance." Am J Physiol **267**(2 Pt 1): C313-339.
- Haddad, G. G. and Jiang, C. (1993). "O<sub>2</sub> deprivation in the central nervous system: On mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury." Progress in Neurobiology **40**(3): 277-318.
- Han, B. H., D'Costa, A., Back, S. A., Parsadanian, M., Patel, S., Shah, A. R., Gidday, J. M., Srinivasan, A., Deshmukh, M. and Holtzman, D. M. (2000). "BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia." Neurobiol Dis **7**(1): 38-53.
- Han, B. H. and Holtzman, D. M. (2000). "BDNF Protects the Neonatal Brain from Hypoxic-Ischemic Injury In Vivo via the ERK Pathway." The Journal of Neuroscience **20**(15): 5775-5781.
- Hansen, N., Widman, G., Hattingen, E., Elger, C. E. and Kunz, W. S. (2017). "Mesial temporal lobe epilepsy associated with KCNT1 mutation." Seizure **45**: 181-183.
- Hardingham, G., J. L. Arnold, F. and Bading, H. (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity."
- Hardingham, G. E. and Bading, H. (2003). "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling." Trends Neurosci **26**(2): 81-89.
- Hardwick, J. M. and Soane, L. (2013). "Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(2): 10.1101/cshperspect.a008722 a008722.
- Hartley, D., Kurth, M., Bjerkness, L., Weiss, J. and Choi, D. (1993). "Glutamate receptor-induced <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration." The Journal of Neuroscience **13**(5): 1993-2000.
- Hartley, D. M. and Choi, D. W. (1989). "Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture." J Pharmacol Exp Ther **250**(2): 752-758.
- Hashimoto, R., Takei, N., Shimazu, K., Christ, L., Lu, B. and Chuang, D.-M. (2002). "Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: An essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity." Neuropharmacology **43**(7): 1173-1179.

Hassel, B. and Dingledine, R. (2012). Chapter 17 - Glutamate and Glutamate Receptors A2 - Brady, Scott T. Basic Neurochemistry (Eighth Edition). G. J. Siegel, R. W. Albers and D. L. Price. New York, Academic Press: 342-366.

Heginbotham, L., Abramson, T. and MacKinnon, R. (1992). "A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels." Science **258**(5085): 1152-1155.

Heinen, A., Strothoff, M., Schmidt, A., Stracke, N., Behmenburg, F., Bauer, I., Hollmann, M. W. and Huhn, R. (2014). "Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway." Exp Gerontol **56**: 99-105.

Henderson, C., Phillips, H., Pollock, R., Davies, A., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R., LC, S. and et, a. (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." Science **266**(5187): 1062-1064.

Henley, J. M. and Wilkinson, K. A. (2013). "AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging." Dialogues Clin Neurosci **15**(1): 11-27.

Henrich-Noack, P., Prehn, J. H. and Kriegelstein, J. (1994). "Neuroprotective effects of TGF-beta 1." J Neural Transm Suppl **43**: 33-45.

Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I. and Philpot, B. D. (2010). "Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions." Progress in neurobiology **91**(1): 23-37.

Herin, G. A. and Aizenman, E. (2004). "Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 101-111.

Heron, S. E., Smith, K. R., Bahlo, M., Nobili, L., Kahana, E., Licchetta, L., Oliver, K. L., Mazarib, A., Afawi, Z., Korczyn, A., Plazzi, G., Petrou, S., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E. and Dibbens, L. M. (2012). "Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Nat Genet **44**(11): 1188-1190.

Hess, D., Nanou, E. and El Manira, A. (2007). "Characterization of Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in larval lamprey spinal cord neurons." J Neurophysiol **97**(5): 3484-3493.

Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J. E. and Xia, Z. (1999). "Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **274**(32): 22569-22580.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-1030.

Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994). "Cloned glutamate receptors." Annu Rev Neurosci **17**: 31-108.

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W. and Heinemann, S. (1989). "Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family." Nature **342**(6250): 643-648.

- Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2001). "Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function." Annual review of neuroscience **24**: 677-736.
- Huang, F., Wang, X., Ostertag, E. M., Nuwal, T., Huang, B., Jan, Y. N., Basbaum, A. I. and Jan, L. Y. (2013). "TMEM16C facilitates Na(+)-activated K+ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing." Nat Neurosci **16**(9): 1284-1290.
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T. and Bear, M. F. (2002). "Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7746-7750.
- Hume, R., Dingledine, R. and Heinemann, S. (1991). "Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability." Science **253**(5023): 1028-1031.
- Humpel, C. (2015). "Organotypic brain slice cultures: A review." Neuroscience **305**: 86-98.
- Hwang, D. and Rhee, S. H. (1999). "Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids." Am J Clin Nutr **70**(4): 545-556.
- Ido, Y. (2007). "Pyridine nucleotide redox abnormalities in diabetes." Antioxid Redox Signal **9**(7): 931-942.
- Ikonomidou, C. and Turski, L. (2002). "Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury?" The Lancet Neurology **1**(6): 383-386.
- International Association for the Study of Pain, I. (2018). "IASP Terminology." Retrieved July 7, 2018, from <http://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>.
- Iqbal Hasham, M., Pelech, S. L. and Krieger, C. (1997). "Glutamate-mediated activation of protein kinase C in hippocampal neurons." Neuroscience Letters **228**(2): 115-118.
- Ishii, A., Shioda, M., Okumura, A., Kidokoro, H., Sakauchi, M., Shimada, S., Shimizu, T., Osawa, M., Hirose, S. and Yamamoto, T. (2013). "A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy." Gene **531**(2): 467-471.
- Jakel, S. and Dimou, L. (2017). "Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation." Front Cell Neurosci **11**: 24.
- Jenkinson, D. H. (2006). "Potassium channels--multiplicity and challenges." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S63-71.
- Jiang, X., Zhu, D., Okagaki, P., Lipsky, R. H., Wu, X., Banaudha, K., Mearow, K., Strauss, K. I. and Marini, A. M. (2003). "N - Methyl - d - aspartate and TrkB Receptor Activation in Cerebellar Granule Cells." Annals of the New York Academy of Sciences **993**(1): 134-145.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T. and MacKinnon, R. (2001). "Structure of the RCK domain from the E. coli K+ channel and demonstration of its presence in the human BK channel." Neuron **29**(3): 593-601.
- Joiner, W. J., Tang, M. D., Wang, L. Y., Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Gan, L., Gribkoff, V. K. and Kaczmarek, L. K. (1998). "Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits." Nat Neurosci **1**(6): 462-469.

- Jonas, P. and Burnashev, N. (1995). "Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels." Neuron **15**(5): 987-990.
- Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. H. and Monyer, H. (1994). "Differences in Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression." Neuron **12**(6): 1281-1289.
- Kaczmarek, L. K. (2013). "Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels." ISRN Neurosci **2013**(2013).
- Kaltschmidt, B. and Kaltschmidt, C. (2000). "Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction." Exp Brain Res **130**(1): 100-104.
- Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H. and Irisawa, H. (1984). "Intracellular Na<sup>+</sup> activates a K<sup>+</sup> channel in mammalian cardiac cells." Nature **309**(5966): 354-356.
- Kanai, Y. and Hediger, M. A. (1992). "Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter." Nature **360**(6403): 467-471.
- Kanai, Y., Smith, C. P. and Hediger, M. A. (1993). "A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters." The FASEB Journal **7**(15): 1450-1459.
- Kataoka, Y., Morii, H., Watanabe, Y. and Ohmori, H. (1997). "A Postsynaptic Excitatory Amino Acid Transporter with Chloride Conductance Functionally Regulated by Neuronal Activity in Cerebellar Purkinje Cells." The Journal of Neuroscience **17**(18): 7017-7024.
- Kauer, J. A. and Malenka, R. C. (2007). "Synaptic plasticity and addiction." Nature Reviews Neuroscience **8**: 844.
- Kawasaki, Y., Kuki, I., Ehara, E., Murakami, Y., Okazaki, S., Kawawaki, H., Hara, M., Watanabe, Y., Kishimoto, S., Suda, K., Saitsu, H. and Matsumoto, N. (2017). "Three Cases of KCNT1 Mutations: Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy with Massive Systemic to Pulmonary Collateral Arteries." The Journal of Pediatrics **191**: 270-274.
- Keelan, J., Vergun, O. and Duchen, M. R. (1999). "Excitotoxic mitochondrial depolarisation requires both calcium and nitric oxide in rat hippocampal neurons." The Journal of Physiology **520**(3): 797-813.
- Kemp, J. A. and McKernan, R. M. (2002). "NMDA receptor pathways as drug targets." Nat Neurosci **5 Suppl**: 1039-1042.
- Kendrick, N. (2014). A gene's mRNA level does not usually predict its protein level.
- Kerr, J. F. (1971). "Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death." J Pathol **105**(1): 13-20.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Khandjian, E. W., Corbin, F., Woerly, S. and Rousseau, F. (1996). "The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes." Nature Genetics **12**: 91.

- Khandjian, E. W., Huot, M. E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R. and Bardoni, B. (2004). "Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13357-13362.
- Kim, G. E. and Kaczmarek, L. K. (2014). "Emerging role of the KCNT1 Slack channel in intellectual disability." Front Cell Neurosci **8**: 209.
- Kim, Grace E., Kronengold, J., Barcia, G., Quraishi, Imran H., Martin, Hilary C., Blair, E., Taylor, Jenny C., Dulac, O., Colleaux, L., Nabbout, R. and Kaczmarek, Leonard K. (2014). "Human Slack Potassium Channel Mutations Increase Positive Cooperativity between Individual Channels." Cell Reports **9**(5): 1661-1672.
- Kim, S., Shin, J.-K., Yoon, H. S. and Kim, J.-H. (2011). "Blockade of ERK Phosphorylation in the Nucleus Accumbens Inhibits the Expression of Cocaine-induced Behavioral Sensitization in Rats." The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology **15**(6): 389-395.
- Kim, T., Lim, C.-S. and Kaang, B.-K. (2015). "Cell type-specific gene expression profiling in brain tissue: comparison between TRAP, LCM and RNA-seq." BMB Reports **48**(7): 388-394.
- Kim, U. and McCormick, D. A. (1998). "Functional and Ionic Properties of a Slow Afterhyperpolarization in Ferret Perigeniculate Neurons In Vitro." Journal of Neurophysiology **80**(3): 1222-1235.
- Kirschner, M. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Amara, S. G. (1994). "Mouse Excitatory Amino Acid Transporter EAAT2: Isolation, Characterization, and Proximity to Neuroexcitability Loci on Mouse Chromosome 2." Genomics **24**(2): 218-224.
- Klagsbrun, M. (1991). "Regulators of angiogenesis: Stimulators, inhibitors, and extracellular matrix." Journal of Cellular Biochemistry **47**(3): 199-200.
- Klockner, U., Storck, T., Conradt, M. and Stoffel, W. (1994). "Functional properties and substrate specificity of the cloned L- glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 from rat brain expressed in *Xenopus* oocytes." The Journal of Neuroscience **14**(10): 5759-5765.
- Knaus, H. G., Schwarzer, C., Koch, R. O., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M. L. and Sperk, G. (1996). "Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals." J Neurosci **16**(3): 955-963.
- Ko, Y., Ament, S. A., Eddy, J. A., Caballero, J., Earls, J. C., Hood, L. and Price, N. D. (2013). "Cell type-specific genes show striking and distinct patterns of spatial expression in the mouse brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(8): 3095-3100.
- Kohr, G. (2006). "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution." Cell Tissue Res **326**(2): 439-446.
- König, H.-G., Kögel, D., Rami, A. and Prehn, J. H. M. (2005). "TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons." implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling **168**(7): 1077-1086.
- Korsching, S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination." J Neurosci **13**(7): 2739-2748.

- Krämer, D. and Minichiello, L. (2010). "Cell culture of primary cerebellar granule cells." Methods Mol Biol **633**: 233-239.
- Krogsgaard-Larsen, P., Honore, T., Hansen, J. J., Curtis, D. R. and Lodge, D. (1980). "New class of glutamate agonist structurally related to ibotenic acid." Nature **284**(5751): 64-66.
- Kuang, Q., Purhonen, P. and Hebert, H. (2015). "Structure of potassium channels." Cell Mol Life Sci **72**(19): 3677-3693.
- Kubota, M. and Saito, N. (1991). "Sodium- and calcium-dependent conductances of neurones in the zebra finch hyperstriatum ventrale pars caudale in vitro." J Physiol **440**: 131-142.
- Kulawiak, B., Kudin, A. P., Szewczyk, A. and Kunz, W. S. (2008). "BK channel openers inhibit ROS production of isolated rat brain mitochondria." Experimental Neurology **212**(2): 543-547.
- Lau, A. and Tymianski, M. (2010). "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **460**(2): 525-542.
- Lau, D., Bengtson, C. P., Buchthal, B. and Bading, H. (2015). "BDNF Reduces Toxic Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling via Synaptic NMDA Receptors and Nuclear-Calcium-Induced Transcription of inhba/Activin A." Cell Rep **12**(8): 1353-1366.
- Lawson, K. and McKay, N. G. (2006). "Modulation of Potassium Channels as a Therapeutic Approach." Current Pharmaceutical Design **12**(4): 459-470.
- Lee, H. G., Ogawa, O., Zhu, X., O'Neill, M. J., Petersen, R. B., Castellani, R. J., Ghanbari, H., Perry, G. and Smith, M. A. (2004). "Aberrant expression of metabotropic glutamate receptor 2 in the vulnerable neurons of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **107**(4): 365-371.
- Lee, H. G., Zhu, X., Casadesus, G., Pallas, M., Camins, A., O'Neill, M. J., Nakanishi, S., Perry, G. and Smith, M. A. (2009). "The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival." Brain Res **1249**: 244-250.
- Lee, H. Y., Greene, L. A., Mason, C. A. and Manzini, M. C. (2009). "Isolation and culture of post-natal mouse cerebellar granule neuron progenitor cells and neurons." J Vis Exp(23).
- Lehre, K. P. and Danbolt, N. C. (1998). "The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain." J Neurosci **18**(21): 8751-8757.
- Levy, L. M., Warr, O. and Attwell, D. (1998). "Stoichiometry of the Glial Glutamate Transporter GLT-1 Expressed Inducibly in a Chinese Hamster Ovary Cell Line Selected for Low Endogenous Na<sup>+</sup>-Dependent Glutamate Uptake." The Journal of Neuroscience **18**(23): 9620-9628.
- Lewen, A., Matz, P. and Chan, P. H. (2000). "Free radical pathways in CNS injury." J Neurotrauma **17**(10): 871-890.
- Lewin, G. R. and Barde, Y. A. (1996). "Physiology of the neurotrophins." Annu Rev Neurosci **19**: 289-317.

- Li, B. and Gao, T. M. (2016). "Functional Role of Mitochondrial and Nuclear BK Channels." Int Rev Neurobiol **128**: 163-191.
- Li, B., Jie, W., Huang, L., Wei, P., Li, S., Luo, Z., Friedman, A. K., Meredith, A. L., Han, M.-H., Zhu, X.-H. and Gao, T.-M. (2014). "Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling." Nature Neuroscience **17**: 1055.
- Li, J., Pelletier, M. R., Perez Velazquez, J. L. and Carlen, P. L. (2002). "Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency." Mol Cell Neurosci **19**(2): 138-151.
- Liao, Y., Kristiansen, A. M., Oksvold, C. P., Tuvnes, F. A., Gu, N., Runden-Pran, E., Ruth, P., Sausbier, M. and Storm, J. F. (2010). "Neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels limit brain infarction and promote survival." PLoS One **5**(12): e15601.
- Lieth, E., LaNoue, K. F., Berkich, D. A., Xu, B., Ratz, M., Taylor, C. and Hutson, S. M. (2001). "Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis." J Neurochem **76**(6): 1712-1723.
- Lim, C. X., Ricos, M. G., Dibbens, L. M. and Heron, S. E. (2016). "KCNT1 mutations in seizure disorders: the phenotypic spectrum and functional effects." Journal of Medical Genetics **53**(4): 217-225.
- Lindholm, D., Dechant, G., Heisenberg, C. P. and Thoenen, H. (1993). "Brain - derived Neurotrophic Factor is a Survival Factor for Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons and Protects them Against Glutamate - induced Neurotoxicity." European Journal of Neuroscience **5**(11): 1455-1464.
- Linton, S. J. and Shaw, W. S. (2011). "Impact of Psychological Factors in the Experience of Pain." Physical Therapy **91**(5): 700-711.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." Physiol Rev **79**(4): 1431-1568.
- Lipton, S. A. (2004). "Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults." NeuroRx **1**(1): 101-110.
- Liu, Q. Y., Schaffner, A. E. and Barker, J. L. (1998). "Kainate induces an intracellular Na<sup>+</sup>-activated current in cultured embryonic rat hippocampal neurones." J Physiol **510 ( Pt 3)**: 721-734.
- Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M. and Wang, Y. T. (2007). "NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both *In Vitro* and *In Vivo*." The Journal of Neuroscience **27**(11): 2846-2857.
- Lomeli, H., Mosbacher, J., Melcher, T., Hoyer, T., Geiger, J. R., Kuner, T., Monyer, H., Higuchi, M., Bach, A. and Seeburg, P. H. (1994). "Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing." Science **266**(5191): 1709-1713.
- Lu, R., Bausch, A. E., Kallenborn-Gerhardt, W., Stoetzer, C., Debruin, N., Ruth, P., Geisslinger, G., Leffler, A., Lukowski, R. and Schmidtko, A. (2015). "Slack channels expressed in sensory neurons control neuropathic pain in mice." J Neurosci **35**(3): 1125-1135.

Lu, Y. M., Yin, H. Z., Chiang, J. and Weiss, J. H. (1996). "Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA/Kainate and NMDA Channels: High Rate of Ca<sup>2+</sup> Influx Underlies Potent Induction of Injury." The Journal of Neuroscience **16**(17): 5457-5465.

Lu, Z. and Xu, S. (2006). "ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis." IUBMB Life **58**(11): 621-631.

Lucas, D. R. and Newhouse, J. P. (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." AMA Arch Ophthalmol **58**(2): 193-201.

Luk, H.-N. and Carmeliet, E. (1990). "Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in cardiac cells: rectification, open probability, block and role in digitalis toxicity." Pflügers Archiv **416**(6): 766-768.

Madden, D. R. (2002). "The structure and function of glutamate receptor ion channels." Nat Rev Neurosci **3**(2): 91-101.

Madry, C., Mesic, I., Bartholomäus, I., Nicke, A., Betz, H. and Laube, B. (2007). "Principal role of NR3 subunits in NR1/NR3 excitatory glycine receptor function." Biochem Biophys Res Commun **354**(1): 102-108.

Maher, P., Dargusch, R., Bodai, L., Gerard, P. E., Purcell, J. M. and Marsh, J. L. (2011). "ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease." Human Molecular Genetics **20**(2): 261-270.

Malenka, R. C. and Nicoll, R. A. (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science **285**(5435): 1870-1874.

Mancini, M., Soldovieri, M. V., Gessner, G., Wissuwa, B., Barrese, V., Boscia, F., Secondo, A., Miceli, F., Franco, C., Ambrosino, P., Canzoniero, L. M. T., Bauer, M., Hoshi, T., Heinemann, S. H. and Tagliatela, M. (2014). "Critical role of large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channels in leptin-induced neuroprotection of N-methyl-D-aspartate-exposed cortical neurons." Pharmacological Research **87**: 80-86.

Mandir, A. S., Poitras, M. F., Berliner, A. R., Herring, W. J., Guastella, D. B., Feldman, A., Poirier, G. G., Wang, Z. Q., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2000). "NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by Poly(ADP-ribose) polymerase." J Neurosci **20**(21): 8005-8011.

Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A. and Costa, E. (1989). "Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death." Molecular Pharmacology **36**(1): 106-112.

Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007). "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Manzini, M. C., Ward, M. S., Zhang, Q., Lieberman, M. D. and Mason, C. A. (2006). "The stop signal revised: immature cerebellar granule neurons in the external germinal layer arrest pontine mossy fiber growth." J Neurosci **26**(22): 6040-6051.

Marini, A. M., Rabin, S. J., Lipsky, R. H. and Mocchetti, I. (1998). "Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate." J Biol Chem **273**(45): 29394-29399.

Markham, M. R., Kaczmarek, L. K. and Zakon, H. H. (2013). "A sodium-activated potassium channel supports high-frequency firing and reduces energetic costs during rapid modulations of action potential amplitude." J Neurophysiol **109**(7): 1713-1723.



- Marrion, N. V. and Tavalin, S. J. (1998). "Selective activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by co-localized Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal neurons." Nature **395**(6705): 900-905.
- Martin, H. C., Kim, G. E., Pagnamenta, A. T., Murakami, Y., Carvill, G. L., Meyer, E., Copley, R. R., Rimmer, A., Barcia, G., Fleming, M. R., Kronengold, J., Brown, M. R., Hudspith, K. A., Broxholme, J., Kanapin, A., Cazier, J. B., Kinoshita, T., Nabbout, R., Consortium, W. G. S., Bentley, D., McVean, G., Heavin, S., Zaiwalla, Z., McShane, T., Mefford, H. C., Shears, D., Stewart, H., Kurian, M. A., Scheffer, I. E., Blair, E., Donnelly, P., Kaczmarek, L. K. and Taylor, J. C. (2014). "Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis." Hum Mol Genet **23**(12): 3200-3211.
- Massieu, L. and Tapia, R. (1997). "Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo." J Neurochem **69**(3): 1151-1160.
- Matsutani, S. and Yamamoto, N. (1997). "Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling." Glia **20**(1): 1-9.
- Mattson, M. P., Guthrie, P. B. and Kater, S. B. (1989). "A role for Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> extrusion in protection against neuronal excitotoxicity." The FASEB Journal **3**(13): 2519-2526.
- Mayer, M. L. (2006). "Glutamate receptors at atomic resolution." Nature **440**: 456.
- Mayer, M. L. and Armstrong, N. (2004). "Structure and function of glutamate receptor ion channels." Annu Rev Physiol **66**: 161-181.
- Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1987). "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones." J Physiol **394**: 501-527.
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y. and Khandjian, E. W. (2002). "Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression." Human Molecular Genetics **11**(24): 3007-3017.
- McAllister, A. K., Katz, L. C. and Lo, D. C. (1999). "Neurotrophins and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **22**: 295-318.
- McCormick, D. A. and von Krosigk, M. (1992). "Corticothalamic activation modulates thalamic firing through glutamate "metabotropic" receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2774-2778.
- McDonald, J. W. and Johnston, M. V. (1990). "Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development." Brain Research Reviews **15**(1): 41-70.
- McDonald, J. W., Silverstein, F. S. and Johnston, M. V. (1988). "Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system." Brain Research **459**(1): 200-203.
- McTague, A., Appleton, R., Avula, S., Cross, J. H., King, M. D., Jacques, T. S., Bhate, S., Cronin, A., Curran, A., Desurkar, A., Farrell, M. A., Hughes, E., Jefferson, R., Lascelles, K., Livingston, J., Meyer, E., McLellan, A., Poduri, A., Scheffer, I. E., Spinty, S., Kurian, M. A. and Kneen, R. (2013). Migrating partial seizures of infancy: expansion of the electroclinical, radiological and pathological disease spectrum.

McTague, A., Nair, U., Malhotra, S., Meyer, E., Trump, N., Gazina, E. V., Papandreou, A., Ngoh, A., Ackermann, S., Ambegaonkar, G., Appleton, R., Desurkar, A., Eltze, C., Kneen, R., Kumar, A. V., Lascelles, K., Montgomery, T., Ramesh, V., Samanta, R., Scott, R. H., Tan, J., Whitehouse, W., Poduri, A., Scheffer, I. E., Chong, W. K. K., Cross, J. H., Topf, M., Petrou, S. and Kurian, M. A. (2018). "Clinical and molecular characterization of KCNT1-related severe early-onset epilepsy." Neurology **90**(1): e55-e66.

Meddows, E., Le Bourdellès, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P. and McIlhinney, R. A. J. (2001). "Identification of Molecular Determinants That Are Important in the Assembly of N-Methyl-D-aspartate Receptors." Journal of Biological Chemistry **276**(22): 18795-18803.

Medicine, I. o. (2011). Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for Disorders of the Nervous System: Workshop Summary. Washington, DC, The National Academies Press.

Meera, P., Wallner, M., Song, M. and Toro, L. (1997). "Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(25): 14066-14071.

Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." J Nutr **130**(4S Suppl): 1007S-1015S.

Mikati, M. A., Jiang, Y.-h., Carboni, M., Shashi, V., Petrovski, S., Spillmann, R., Milligan, C. J., Li, M., Grefe, A., McConkie, A., Berkovic, S., Scheffer, I., Mullen, S., Bonner, M., Petrou, S. and Goldstein, D. (2015). "Quinidine in the treatment of KCNT1 positive epilepsies." Annals of Neurology: n/a-n/a.

Milh, M., Falace, A., Villeneuve, N., Vanni, N., Cacciagli, P., Assereto, S., Nabbout, R., Benfenati, F., Zara, F., Chabrol, B., Villard, L. and Fassio, A. (2013). "Novel compound heterozygous mutations in TBC1D24 cause familial malignant migrating partial seizures of infancy." Hum Mutat **34**(6): 869-872.

Milligan, C. J., Li, M., Gazina, E. V., Heron, S. E., Nair, U., Trager, C., Reid, C. A., Venkat, A., Younkin, D. P., Dlugos, D. J., Petrovski, S., Goldstein, D. B., Dibbens, L. M., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F. and Petrou, S. (2014). "KCNT1 gain of function in 2 epilepsy phenotypes is reversed by quinidine." Ann Neurol **75**(4): 581-590.

Møller, R. S., Heron, S. E., Larsen, L. H. G., Lim, C. X., Ricos, M. G., Bayly, M. A., van Kempen, M. J. A., Klinkenberg, S., Andrews, I., Kelley, K., Ronen, G. M., Callen, D., McMahon, J. M., Yendle, S. C., Carvill, G. L., Mefford, H. C., Nabbout, R., Poduri, A., Striano, P., Baglietto, M. G., Zara, F., Smith, N. J., Pridmore, C., Gardella, E., Nikanorova, M., Dahl, H. A., Gellert, P., Scheffer, I. E., Gunning, B., Kragh-Olsen, B. and Dibbens, L. M. (2015). "Mutations in KCNT1 cause a spectrum of focal epilepsies." Epilepsia **9**: e114–e120

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.

Mosbacher, J., Schoepfer, R., Monyer, H., Burnashev, N., Seeburg, P. H. and Ruppertsberg, J. P. (1994). "A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors." Science **266**(5187): 1059-1062.

Muir, K. W. (2006). "Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists." Current Opinion in Pharmacology **6**(1): 53-60.

- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Nadler, J. V., Perry, B. W. and Cotman, C. W. (1978). "Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells." Nature **271**: 676.
- Nakamoto, M., Nalavadi, V., Epstein, M. P., Narayanan, U., Bassell, G. J. and Warren, S. T. (2007). "Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(39): 15537-15542.
- Nakanishi, N., Tu, S., Shin, Y., Cui, J., Kurokawa, T., Zhang, D., Chen, H. S. V., Tong, G. and Lipton, S. A. (2009). "Neuroprotection by the NR3A Subunit of the NMDA Receptor." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**(16): 5260-5265.
- Nakanishi, S. and Masu, M. (1994). "Molecular diversity and functions of glutamate receptors." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 319-348.
- Nanou, E. and El Manira, A. (2007). "A postsynaptic negative feedback mediated by coupling between AMPA receptors and Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in spinal cord neurones." Eur J Neurosci **25**(2): 445-450.
- Nanou, E., Kyriakatos, A., Bhattacharjee, A., Kaczmarek, L. K., Paratcha, G. and El Manira, A. (2008). "Na<sup>+</sup>-mediated coupling between AMPA receptors and KNa channels shapes synaptic transmission." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20941-20946.
- Ngo-Anh, T. J., Bloodgood, B. L., Lin, M., Sabatini, B. L., Maylie, J. and Adelman, J. P. (2005). "SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines." Nat Neurosci **8**(5): 642-649.
- Nicholls, D. and Attwell, D. (1990). "The release and uptake of excitatory amino acids." Trends Pharmacol Sci **11**(11): 462-468.
- Nicholls, D. G. (2004). "Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures." Curr Mol Med **4**(2): 149-177.
- Nicholls, D. G. and Ward, M. W. (2000). "Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts." Trends in Neurosciences **23**(4): 166-174.
- Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P. and Ibanez, C. F. (1998). "Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish." FEBS Lett **424**(3): 285-290.
- Noraberg, J., Poulsen, F. R., Blaabjerg, M., Kristensen, B. W., Bonde, C., Montero, M., Meyer, M., Gramsbergen, J. B. and Zimmer, J. (2005). "Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair." Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorders **4**(4): 435-452.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." Nature **307**(5950): 462-465.
- Nutt, S. L. and Kamboj, R. K. (1994). "Differential RNA editing efficiency of AMPA receptor subunit GluR-2 in human brain." Neuroreport **5**(13): 1679-1683.

Nuwer, M. O., Picchione, K. E. and Bhattacharjee, A. (2010). "PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability." J Neurosci **30**(42): 14165-14172.

Nwosu, V. K., Royer, J. A. and Stickler, D. E. (2010). "Voltage gated potassium channel antibodies in amyotrophic lateral sclerosis." Amyotroph Lateral Scler **11**(4): 392-394.

O'Donnell, W. T. and Warren, S. T. (2002). "A decade of molecular studies of fragile X syndrome." Annu Rev Neurosci **25**: 315-338.

O'Hara, P. J., Sheppard, P. O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B. A., McGrane, V., Houamed, K. M., Thomsen, C., Gilbert, T. L. and Mulvihill, E. R. (1993). "The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins." Neuron **11**(1): 41-52.

Ohtahara, S., Yamatogi, Y. and Ohtsuka, Y. (1976). "Prognosis of the Lennox syndrome-long-term clinical and electroencephalographic follow-up study, especially with special reference to relationship with the West syndrome." Folia Psychiatr Neurol Jpn **30**(3): 275-287.

Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." Science **164**(3880): 719-721.

Olney, J. W. (1989). "Excitotoxicity and N-methyl-D-Aspartate receptors." Drug Development Research **17**(4): 299-319.

Olney, J. W., Collins, R. C. and Sloviter, R. S. (1986). "Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage." Adv Neurol **44**: 857-877.

Olney, J. W., Ho, O. L. and Rhee, V. (1971). "Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system." Experimental Brain Research **14**(1): 61-76.

Oltval, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-619.

Oostra, B. A. and Willemsen, R. (2003). "A fragile balance: FMR1 expression levels." Hum Mol Genet **12 Spec No 2**: R249-257.

Oostra, B. A. and Willemsen, R. (2009). "FMR1: a gene with three faces." Biochim Biophys Acta **1790**(6): 467-477.

Ortega, F. J., Gimeno-Bayon, J., Espinosa-Parrilla, J. F., Carrasco, J. L., Batlle, M., Pugliese, M., Mahy, N. and Rodríguez, M. J. (2012). "ATP-dependent potassium channel blockade strengthens microglial neuroprotection after hypoxia-ischemia in rats." Experimental Neurology **235**(1): 282-296.

Ortuño-Sahagún, D., González, R. M., Verdaguer, E., Huerta, V. C., Torres-Mendoza, B. M., Lemus, L., Rivera-Cervantes, M. C., Camins, A. and Zárate, C. B. (2014). "Glutamate Excitotoxicity Activates the MAPK/ERK Signaling Pathway and Induces the Survival of Rat Hippocampal Neurons In Vivo." Journal of Molecular Neuroscience **52**(3): 366-377.

- Pabbidi, R. M., Cao, D.-S., Parihar, A., Pauza, M. E. and Premkumar, L. S. (2008). "Direct Role of Streptozotocin in Inducing Thermal Hyperalgesia by Enhanced Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Sensory Neurons." Molecular Pharmacology **73**(3): 995-1004.
- Panchenko, V. A., Glasser, C. R. and Mayer, M. L. (2001). "Structural Similarities between Glutamate Receptor Channels and K<sup>+</sup> Channels Examined by Scanning Mutagenesis." The Journal of General Physiology **117**(4): 345-360.
- Paoletti, P., Bellone, C. and Zhou, Q. (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.
- Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Le Goff, A., Callebaut, I. and Neyton, J. (2000). "Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit." Neuron **28**(3): 911-925.
- Partin, K. M., Fleck, M. W. and Mayer, M. L. (1996). "AMPA Receptor Flip/Flop Mutants Affecting Deactivation, Desensitization, and Modulation by Cyclothiazide, Aniracetam, and Thiocyanate." The Journal of Neuroscience **16**(21): 6634-6647.
- Partin, K. M., Patneau, D. K. and Mayer, M. L. (1994). "Cyclothiazide differentially modulates desensitization of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor splice variants." Mol Pharmacol **46**(1): 129-138.
- Paulais, M., Lachheb, S. and Teulon, J. (2006). "A Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in the thick ascending limb of mouse kidney." J Gen Physiol **127**(2): 205-215.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.
- Peng, P. L., Zhong, X., Tu, W., Soundarapandian, M. M., Molner, P., Zhu, D., Lau, L., Liu, S., Liu, F. and Lu, Y. (2006). "ADAR2-Dependent RNA Editing of AMPA Receptor Subunit GluR2 Determines Vulnerability of Neurons in Forebrain Ischemia." Neuron **49**(5): 719-733.
- Peng, T. I., Jou, M. J., Sheu, S. S. and Greenamyre, J. T. (1998). "Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons." Exp Neurol **149**(1): 1-12.
- Pennypacker, K. R., Hong, J. S., Mullis, S. B., Hudson, P. M. and McMillian, M. K. (1996). "Transcription factors in primary glial cultures: changes with neuronal interactions." Brain Res Mol Brain Res **37**(1-2): 224-230.
- Perez-Capote, K., Serratos, J. and Sola, C. (2004). "Glial activation modulates glutamate neurotoxicity in cerebellar granule cell cultures." Glia **45**(3): 258-268.
- Perez-Otano, I., Larsen, R. S. and Wesseling, J. F. (2016). "Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS." Nat Rev Neurosci **17**(10): 623-635.
- Perge, J. A., Niven, J. E., Mugnaini, E., Balasubramanian, V. and Sterling, P. (2012). "Why do axons differ in caliber?" The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **32**(2): 626-638.
- Pin, J. P. and Duvoisin, R. (1995). "The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions." Neuropharmacology **34**(1): 1-26.

Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. and Kanner, B. I. (1992). "Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter." Nature **360**(6403): 464-467.

Platt, S. R. (2007). "The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review." The Veterinary Journal **173**(2): 278-286.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores." Physiol Rev **74**(3): 595-636.

Prehn, J. H. M., Backhaus, C. and Kriegstein, J. (1993). "Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Prevents Glutamate Neurotoxicity in Rat Neocortical Cultures and Protects Mouse Neocortex from Ischemic Injury in vivo." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **13**(3): 521-525.

Prybylowski, K. and Wenthold, R. J. (2004). "N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse." J Biol Chem **279**(11): 9673-9676.

Purves, D., Augustine, G. J. and Fitzpatrick, D. (2001). Neuroscience Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J. and Paoletti, P. (2005). "The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B." J Neurosci **25**(2): 308-317.

Ramnani, N. (2006). "The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function." Nature Reviews Neuroscience **7**: 511.

Randall, R. and Thayer, S. (1992). "Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons." The Journal of Neuroscience **12**(5): 1882-1895.

Ribeiro, F. M., Paquet, M., Ferreira, L. T., Cregan, T., Swan, P., Cregan, S. P. and Ferguson, S. S. (2010). "Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease." J Neurosci **30**(1): 316-324.

Rizzi, S., Knaus, H.-G. and Schwarzer, C. (2016). "Differential distribution of the sodium-activated potassium channels Slick and Slack in mouse brain." Journal of Comparative Neurology **524**: 2093-2116.

Roberts, A. C., Diez-Garcia, J., Rodriguiz, R. M., Lopez, I. P., Lujan, R., Martinez-Turrillas, R., Pico, E., Henson, M. A., Bernardo, D. R., Jarrett, T. M., Clendeninn, D. J., Lopez-Mascaraque, L., Feng, G., Lo, D. C., Wesseling, J. F., Wetsel, W. C., Philpot, B. D. and Perez-Otano, I. (2009). "Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation." Neuron **63**(3): 342-356.

Roberts, E. and Frankel, S. (1950). "gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid." J Biol Chem **187**(1): 55-63.

Roof, R. L. and Hall, E. D. (2000). "Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats." J Neurotrauma **17**(12): 1155-1169.

Rose, C. R. (2002). "Book Review: Na<sup>+</sup> Signals at Central Synapses." The Neuroscientist **8**(6): 532-539.

- Rosenberg, P. A. and Aizenman, E. (1989). "Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex." Neurosci Lett **103**(2): 162-168.
- Rosenberg, P. A., Amin, S. and Leitner, M. (1992). "Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture." J Neurosci **12**(1): 56-61.
- Roskoski, R., Jr. (2012). "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." Pharmacol Res **66**(2): 105-143.
- Rothman, S. M. (1985). "The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx." J Neurosci **5**(6): 1483-1489.
- Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1987). "Excitotoxicity and the NMDA receptor." Trends in Neurosciences **10**(7): 299-302.
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A. and Steve White, H. (2012). "Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control." Neurochemistry International **61**(4): 546-558.
- Rudge, J. S., Mather, P. E., Pasnikowski, E. M., Cai, N., Corcoran, T., Acheson, A., Anderson, K., Lindsay, R. M. and Wiegand, S. J. (1998). "Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective." Exp Neurol **149**(2): 398-410.
- Rudge, J. S., Mather, P. E., Pasnikowski, E. M., Cai, N., Corcoran, T., Acheson, A., Anderson, K., Lindsay, R. M. and Wiegand, S. J. (1998). "Endogenous BDNF Protein Is Increased in Adult Rat Hippocampus after a Kainic Acid Induced Excitotoxic Insult but Exogenous BDNF Is Not Neuroprotective." Experimental Neurology **149**(2): 398-410.
- Ruffin, V. A., Gu, X. Q., Zhou, D., Douglas, R. M., Sun, X., Trouth, C. O. and Haddad, G. G. (2008). "The sodium-activated potassium channel Slack is modulated by hypercapnia and acidosis." Neuroscience **151**(2): 410-418.
- Ruigrok, T., Sillitoe, R. V. and Voogd, J. (2014). Cerebellum and Cerebellar Connections.
- Ruigrok, T. J. H. (2011). "Ins and Outs of Cerebellar Modules." Cerebellum (London, England) **10**(3): 464-474.
- Rungta, Ravi L., Choi, Hyun B., Tyson, John R., Malik, A., Dissing-Olesen, L., Lin, Paulo J. C., Cain, Stuart M., Cullis, Pieter R., Snutch, Terrance P. and MacVicar, Brian A. (2015). "The Cellular Mechanisms of Neuronal Swelling Underlying Cytotoxic Edema." Cell **161**(3): 610-621.
- Safronov, B. V. and Vogel, W. (1996). "Properties and functions of Na(+)-activated K+ channels in the soma of rat motoneurons." The Journal of Physiology **497**(Pt 3): 727-734.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C. and Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. Nat Rev Neurosci. **7**: 921-931.
- Sanchez-Vives, M. V., Nowak, L. G. and McCormick, D. A. (2000). "Cellular Mechanisms of Long-Lasting Adaptation in Visual Cortical Neurons In Vitro." The Journal of Neuroscience **20**(11): 4286-4299.

- Sandhiya, S. and Dkhar, S. A. (2009). "Potassium channels in health, disease & development of channel modulators." Indian J Med Res **129**(3): 223-232.
- Sandler, V. M., Puil, E. and Schwarz, D. W. F. (1998). "Intrinsic response properties of bursting neurons in the nucleus principalis trigemini of the gerbil." Neuroscience **83**(3): 891-904.
- Santi, C. M., Ferreira, G., Yang, B., Gazula, V. R., Butler, A., Wei, A., Kaczmarek, L. K. and Salkoff, L. (2006). "Opposite regulation of Slick and Slack K<sup>+</sup> channels by neuromodulators." J Neurosci **26**(19): 5059-5068.
- Sasaki, Y., Araki, T. and Milbrandt, J. (2006). "Stimulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthetic Pathways Delays Axonal Degeneration after Axotomy." The Journal of Neuroscience **26**(33): 8484-8491.
- Sato, M., Suzuki, K. and Nakanishi, S. (2001). "NMDA Receptor Stimulation and Brain-Derived Neurotrophic Factor Upregulate Homer 1a mRNA via the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Cultured Cerebellar Granule Cells." The Journal of Neuroscience **21**(11): 3797-3805.
- Sato, T., Saito, T., Saegusa, N. and Nakaya, H. (2005). "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A." Circulation **111**(2): 198-203.
- Sattler, R., Charlton, M. P., Hafner, M. and Tymianski, M. (1998). "Distinct Influx Pathways, Not Calcium Load, Determine Neuronal Vulnerability to Calcium Neurotoxicity." Journal of Neurochemistry **71**(6): 2349-2364.
- Sattler, R. and Tymianski, M. (2000). "Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity." Journal of Molecular Medicine **78**(1): 3-13.
- Sausbier, U., Sausbier, M., Sailer, C. A., Arntz, C., Knaus, H.-G., Neuhuber, W. and Ruth, P. (2005). "Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the BK-type in the mouse brain." Histochemistry and Cell Biology **125**(6): 725.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J. L., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Moine, H. (2001). "The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif." Embo j **20**(17): 4803-4813.
- Schinder, A. F., Olson, E. C., Spitzer, N. C. and Montal, M. (1996). "Mitochondrial Dysfunction Is a Primary Event in Glutamate Neurotoxicity." The Journal of Neuroscience **16**(19): 6125-6133.
- Schmid, A., Hallermann, S., Kittel, R. J., Khorramshahi, O., Frolich, A. M., Quentin, C., Rasse, T. M., Mertel, S., Heckmann, M. and Sigrist, S. J. (2008). "Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo." Nat Neurosci **11**(6): 659-666.
- Schmidtko, A., Tegeder, I. and Geisslinger, G. (2009). "No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing." Trends in Neurosciences **32**(6): 339-346.
- Schoepp, D. D. (2001). "Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 12-20.
- Schoepp, D. D., Jane, D. E. and Monn, J. A. (1999). "Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors." Neuropharmacology **38**(10): 1431-1476.



- Schousboe, A. (1981). "Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells." Int Rev Neurobiol **22**: 1-45.
- Schousboe, A. and Waagepetersen, H. S. (2007). "GABA: homeostatic and pharmacological aspects." Prog Brain Res **160**: 9-19.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M. and Salkoff, L. (1998). "Slo3, a Novel pH-sensitive K<sup>+</sup> Channel from Mammalian Spermatoocytes." Journal of Biological Chemistry **273**(6): 3509-3516.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M. (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." Nature **473**: 337.
- Schwarcz, R. and Coyle, J. T. (1977). "Striatal lesions with kainic acid: neurochemical characteristics." Brain Res **127**(2): 235-249.
- Schwindt, P. C., Spain, W. J. and Crill, W. E. (1989). "Long-lasting reduction of excitability by a sodium-dependent potassium current in cat neocortical neurons." Journal of Neurophysiology **61**(2): 233-244.
- Seal, R. P. and Amara, S. G. (1999). "Excitatory amino acid transporters: a family in flux." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 431-456.
- Seeburg, P. H. (1996). "The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties." J Neurochem **66**(1): 1-5.
- Seeburg, P. H., Burnashev, N., Kohr, G., Kuner, T., Sprengel, R. and Monyer, H. (1995). "The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector." Recent Prog Horm Res **50**: 19-34.
- Segal, R. A. and Greenberg, M. E. (1996). "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors." Annu Rev Neurosci **19**: 463-489.
- Semkova, I. and Kriegstein, J. (1999). "Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors." Brain Research Reviews **30**(2): 176-188.
- Shan, Y., Carlock, L. R. and Walker, P. D. (1997). "NMDA receptor overstimulation triggers a prolonged wave of immediate early gene expression: relationship to excitotoxicity." Exp Neurol **144**(2): 406-415.
- Sharma, S. S., Kumar, A. and Kaundal, R. K. (2008). "Protective effects of 4-amino-1,8-naphthalimide, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor in experimental diabetic neuropathy." Life Sciences **82**(11): 570-576.
- Shen, Y., Wu, S.-Y., Rancic, V., Qian, Y., Miyashita, S.-I., Ballanyi, K., Campbell, R. E. and Dong, M. (2018). "Genetically encoded ratiometric indicators for potassium ion." bioRxiv.
- Sheng, M. and Lee, S. H. (2001). "AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission." Cell **105**(7): 825-828.
- Sheng, M., McFadden, G. and Greenberg, M. E. (1990). "Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB." Neuron **4**(4): 571-582.

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P. J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. and Mizuno, N. (1997). "Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus." J Neurosci **17**(19): 7503-7522.

Shinozaki, H. and Konishi, S. (1970). "Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones." Brain Res **24**(2): 368-371.

Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. and Meldrum, B. S. (1984). "Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain." Science **226**(4676): 850-852.

Sims, K. D. and Robinson, M. B. (1999). "Expression Patterns and Regulation of Glutamate Transporters in the Developing and Adult Nervous System." **13**(2): 169-197.

Singh, H., Lu, R., Bopassa, J. C., Meredith, A. L., Stefani, E. and Toro, L. (2013). "MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(26): 10836-10841.

Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1996). "Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them." Mol Cell Biol **16**(7): 3825-3832.

Sladeczek, F., Pin, J. P., Recasens, M., Bockaert, J. and Weiss, S. (1985). "Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones." Nature **317**(6039): 717-719.

Smith, C. O., Wang, Y. T., Nadtochiy, S. M., Miller, J. H., Jonas, E. A., Dirksen, R. T., Nehrke, K. and Brookes, P. S. (2018). "Cardiac metabolic effects of KNa1.2 channel deletion, and evidence for its mitochondrial localization." bioRxiv.

Snider, W. D. and Johnson, E. M., Jr. (1989). "Neurotrophic molecules." Ann Neurol **26**(4): 489-506.

Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1990). "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." Science **249**(4976): 1580-1585.

Song, G., Ouyang, G. and Bao, S. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." Journal of Cellular and Molecular Medicine **9**(1): 59-71.

Sonkusare, S. K., Kaul, C. L. and Ramarao, P. (2005). "Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope." Pharmacological Research **51**(1): 1-17.

Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C. and Darnell, R. B. (2004). "Fragile X Mental Retardation Protein Is Associated with Translating Polyribosomes in Neuronal Cells." The Journal of Neuroscience **24**(33): 7272-7276.

Steinlein, O. K., Mulley, J. C., Propping, P., Wallace, R. H., Phillips, H. A., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E. and Berkovic, S. F. (1995). "A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy." Nat Genet **11**(2): 201-203.

- Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J. and Heinemann, S. F. (1994). "Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins." Neuron **13**(6): 1345-1357.
- Stocker, M. (2004). "Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family." Nat Rev Neurosci **5**(10): 758-770.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. and Stoffel, W. (1992). "Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10955-10959.
- Stowe, D. F., Aldakkak, M., Camara, A. K., Riess, M. L., Heinen, A., Varadarajan, S. G. and Jiang, M. T. (2006). "Cardiac mitochondrial preconditioning by Big Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel opening requires superoxide radical generation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H434-440.
- Strohm, C., Barancik, M., von Bruehl, M., Strniskova, M., Ullmann, C., Zimmermann, R. and Schaper, W. (2002). "Transcription inhibitor actinomycin-D abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning." Cardiovasc Res **55**(3): 602-618.
- Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M. and Gouaux, E. (2002). "Mechanism of glutamate receptor desensitization." Nature **417**(6886): 245-253.
- Susan, I. V. J., Paul, J. S., Peggy, E. S. and Christopher, T. B., Jr. (2007). "Potassium Channel Blockers and Openers as CNS Neurologic Therapeutic Agents." Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued) **2**(3): 200-228.
- Swanson, G. T., Kamboj, S. K. and Cull-Candy, S. G. (1997). "Single-Channel Properties of Recombinant AMPA Receptors Depend on RNA Editing, Splice Variation, and Subunit Composition." The Journal of Neuroscience **17**(1): 58-69.
- Swensen, A. M. and Bean, B. P. (2003). "Ionic Mechanisms of Burst Firing in Dissociated Purkinje Neurons." The Journal of Neuroscience **23**(29): 9650-9663.
- Tamsett, T. J., Picchione, K. E. and Bhattacharjee, A. (2009). "NAD<sup>+</sup> activates KNa channels in dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **29**(16): 5127-5134.
- Tang, Q.-Y., Zhang, F.-F., Xu, J., Wang, R., Chen, J., Logothetis, Diomedes E. and Zhang, Z. (2016). "Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms." Cell Reports **14**(1): 129-139.
- Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F. C. and Brown, D. A. (2001). "Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine." J Neurosci **21**(15): 5535-5545.
- ten Hove, M., Jansen, M. A., Nederhoff, M. G. and Van Echteld, C. J. (2007). "Combined blockade of the Na<sup>+</sup> channel and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger virtually prevents ischemic Na<sup>+</sup> overload in rat hearts." Mol Cell Biochem **297**(1-2): 101-110.
- Thomson, S. J., Hansen, A. and Sanguinetti, M. C. (2015). "Identification of the Intracellular Na<sup>+</sup> Sensor in Slo2.1 Potassium Channels." Journal of Biological Chemistry **290**(23): 14528-14535.
- Tobias, M., Marc, G. and Luis, S. (2009). "Correlation of mRNA and protein in complex biological samples." FEBS Letters **583**(24): 3966-3973.

- Tomasello, D. L., Gancarz-Kausch, A. M., Dietz, D. M. and Bhattacharjee, A. (2015). "Transcriptional Regulation of the Sodium-activated Potassium Channel SLICK (KCNT2) Promoter by Nuclear Factor- $\kappa$ B." Journal of Biological Chemistry **290**(30): 18575-18583.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J. and Dingledine, R. (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." Pharmacol Rev **62**(3): 405-496.
- Turk, D. C. and Okifuji, A. (2002). "Psychological factors in chronic pain: evolution and revolution." J Consult Clin Psychol **70**(3): 678-690.
- Uchino, S., Wada, H., Honda, S., Hirasawa, T., Yanai, S., Nakamura, Y., Ondo, Y. and Kohsaka, S. (2003). "Slo2 sodium-activated K<sup>+</sup> channels bind to the PDZ domain of PSD-95." Biochem Biophys Res Commun **310**(4): 1140-1147.
- Vandenberg, R. J. and Ryan, R. M. (2013). "Mechanisms of Glutamate Transport." Physiological Reviews **93**(4): 1621-1657.
- Vanderver, A., Simons, C., Schmidt, J. L., Pearl, P. L., Bloom, M., Lavenstein, B., Miller, D., Grimmond, S. M. and Taft, R. J. (2013). "Identification of a Novel de Novo p.Phe932Ile KCNT1 Mutation in a Patient With Leukoencephalopathy and Severe Epilepsy." Pediatric Neurology **50**(1): 112-114.
- Velaz-Faircloth, M., McGraw, T. S., alandro, M. S., R. T. Fremeau, J., Kilberg, M. S. and Anderson, K. J. (1996). "Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1 in rat brain." American Journal of Physiology-Cell Physiology **270**(1): C67-C75.
- Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H. and Sakmann, B. (1991). "Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels." Science **252**(5013): 1715-1718.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P. and et al. (1991). "Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome." Cell **65**(5): 905-914.
- Verkhratsky, A. and Kirchhoff, F. (2007). "NMDA Receptors in glia." Neuroscientist **13**(1): 28-37.
- Virgili, N., Mancera, P., Wappenhans, B., Sorrosal, G., Biber, K., Pugliese, M. and Espinosa-Parrilla, J. F. (2013). "K(ATP) channel opener diazoxide prevents neurodegeneration: a new mechanism of action via antioxidative pathway activation." PLoS One **8**(9): e75189.
- Vivanco, I. and Sawyers, C. L. (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer." Nature Reviews Cancer **2**: 489.
- Vogel, C., de Sousa Abreu, R., Ko, D., Le, S. Y., Shapiro, B. A., Burns, S. C., Sandhu, D., Boutz, D. R., Marcotte, E. M. and Penalva, L. O. (2010). "Sequence signatures and mRNA concentration can explain two - thirds of protein abundance variation in a human cell line." Molecular Systems Biology **6**(1).
- Voogd, J. and Glickstein, M. (1998). "The anatomy of the cerebellum." Trends Neurosci **21**(9): 370-375.

- Vornov, J. J., Tasker, R. C. and Coyle, J. T. (1991). "Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures." Experimental Neurology **114**(1): 11-22.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. and Vyklicky, L. (2014). "Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels." Physiol Res **63 Suppl 1**: S191-203.
- Wang, F., Yuan, T., Pereira, A., Verkhratsky, A. and Huang, J. H. (2016). "Glial Cells and Synaptic Plasticity." Neural Plasticity **2016**: 5042902.
- Wang, J., Zhai, Q., Chen, Y., Lin, E., Gu, W., McBurney, M. W. and He, Z. (2005). "A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration." The Journal of Cell Biology **170**(3): 349-355.
- Wang, Q. and Andreasson, K. (2010). "The Organotypic Hippocampal Slice Culture Model for Examining Neuronal Injury." Journal of Visualized Experiments : JoVE(44): 2106.
- Wang, Z. Q., Wu, D. C., Huang, F. P. and Yang, G. Y. (2004). "Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia." Brain Res **996**(1): 55-66.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M. (1993). "Distinct distributions of five N - methyl - D - aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain." Journal of Comparative Neurology **338**(3): 377-390.
- Watanabe, M., Mishina, M. and Inoue, Y. (1994). "Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum." Journal of Comparative Neurology **343**(4): 513-519.
- Watkins, J. C. (1962). "The Synthesis of Some Acidic Amino Acids Possessing Neuropharmacological Activity." Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry **5**(6): 1187-1199.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. and Marais, R. (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-885.
- Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J., II and Niedzielski, A. S. (1996). "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons." J Neurosci **16**(6): 1982-1989.
- Wenthold, R. J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N. and Petralia, R. S. (2003). "Trafficking of NMDA receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 335-358.
- Werth, J. L. and Thayer, S. A. (1994). "Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **14**(1): 348-356.
- White, R. J. and Reynolds, I. J. (1996). "Mitochondrial Depolarization in Glutamate-Stimulated Neurons: An Early Signal Specific to Excitotoxin Exposure." The Journal of Neuroscience **16**(18): 5688-5697.
- Wild, K. (2016). "Expression und Funktion des Na<sup>+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals Slack in Granularzellen des Cerebellums." Master of Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Tübingen.

- Willemssen, R., Levenga, J. and Oostra, B. A. (2011). "CGG repeat in the FMR1 gene: size matters." Clin Genet **80**(3): 214-225.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A. and Balis, U. J. (1997). "The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control." Biotechniques **22**(1): 176-181.
- Wo, Z. G. and Oswald, R. E. (1994). "Transmembrane Topology of Two Kainate Receptor Subunits Revealed by N- Glycosylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(15): 7154-7158.
- Wolf, I. and Seger, R. (2002). "The mitogen-activated protein kinase signaling cascade: from bench to bedside." Isr Med Assoc J **4**(8): 641-647.
- Wollmuth, L. P., Kuner, T. and Sakmann, B. (1998). "Intracellular Mg(2+) interacts with structural determinants of the narrow constriction contributed by the NR1-subunit in the NMDA receptor channel." The Journal of Physiology **506**(Pt 1): 33-52.
- Wollmuth, L. P. and Sobolevsky, A. I. (2004). "Structure and gating of the glutamate receptor ion channel." Trends in Neurosciences **27**(6): 321-328.
- Wolterbeek, H. T. and Meer, A. J. G. M. v. d. (2005). "Optimization, Application, and Interpretation of Lactate Dehydrogenase Measurements in Microwell Determination of Cell Number and Toxicity." ASSAY and Drug Development Technologies **3**(6): 675-682.
- Womack, M. D. and Khodakhah, K. (2004). "Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells." J Neurosci **24**(14): 3511-3521.
- World Health Organization, W. (2018). "Mental Health, Neurology and public health." Retrieved July 5, 2018, from [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/epilepsy/en/](http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/en/).
- Wright, A. and Vissel, B. (2012). "The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain." Front Mol Neurosci **5**: 34.
- Wu, S. N. (2003). "Large-conductance Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels: physiological role and pharmacology." Curr Med Chem **10**(8): 649-661.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Xia, X. M., Zhang, X. and Lingle, C. J. (2004). "Ligand-dependent activation of Slo family channels is defined by interchangeable cytosolic domains." J Neurosci **24**(24): 5585-5591.
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K. and Greenberg, M. E. (1996). "Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism." J Neurosci **16**(17): 5425-5436.
- Xuan, W., Daming, Z., Xueying, J., Peter, O., Karen, M., Guanshan, Z., Sherman, M., Krishna, B., H., L. R. and M., M. A. (2004). "AMPA protects cultured neurons against glutamate excitotoxicity through a phosphatidylinositol 3 - kinase - dependent activation in extracellular signal - regulated kinase to upregulate BDNF gene expression." Journal of Neurochemistry **90**(4): 807-818.

- Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K. and Inoue, Y. (1996). "EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses." Neuroreport **7**(12): 2013-2017.
- Yamashita, K., Wiessner, C., Lindholm, D., Thoenen, H. and Hossmann, K. A. (1997). "Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat." Metab Brain Dis **12**(4): 271-280.
- Yang, B., Desai, R. and Kaczmarek, L. K. (2007). "Slack and Slick K(Na) channels regulate the accuracy of timing of auditory neurons." J Neurosci **27**(10): 2617-2627.
- Yang, B., Gribkoff, V. K., Pan, J., Damagnez, V., Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Bhattacharjee, A., Yan, Y., Sigworth, F. J. and Kaczmarek, L. K. (2006). "Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels." Neuropharmacology **51**(4): 896-906.
- Yao, Y. and Mayer, M. L. (2006). "Characterization of a Soluble Ligand Binding Domain of the NMDA Receptor Regulatory Subunit NR3A." The Journal of Neuroscience **26**(17): 4559-4566.
- Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A. and Salkoff, L. (2000). "SLO-2, a K<sup>+</sup> channel with an unusual Cl<sup>-</sup> dependence." Nat Neurosci **3**(8): 771-779.
- Yuan, A., Santi, C. M., Wei, A., Wang, Z. W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C. M. and Salkoff, L. (2003). "The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family." Neuron **37**(5): 765-773.
- Zamalloa, T., Bailey, C. P. and Pineda, J. (2009). "Glutamate-induced post-activation inhibition of locus coeruleus neurons is mediated by AMPA/kainate receptors and sodium-dependent potassium currents." Br J Pharmacol **156**(4): 649-661.
- Zerangue, N., Arriza, J. L., Amara, S. G. and Kavanaugh, M. P. (1995). "Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid." J Biol Chem **270**(12): 6433-6435.
- Zhang, S. C. and Fedoroff, S. (1996). "Neuron-microglia interactions in vitro." Acta Neuropathol **91**(4): 385-395.
- Zhang, X., Zeng, X. and Lingle, C. J. (2006). "Slo3 K(+) Channels: Voltage and pH Dependence of Macroscopic Currents." The Journal of General Physiology **128**(3): 317-336.
- Zhang, X. M., Zhu, S. W., Duan, R. S., Mohammed, A. H., Winblad, B. and Zhu, J. (2008). "Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice." Neurotoxicology **29**(3): 406-412.
- Zhang, Y., Brown, M. R., Hyland, C., Chen, Y., Kronengold, J., Fleming, M. R., Kohn, A. B., Moroz, L. L. and Kaczmarek, L. K. (2012). "Regulation of neuronal excitability by interaction of fragile x mental retardation protein with slack potassium channels." J Neurosci **32**(44): 15318-15327.
- Zhang, Z., Rosenhouse-Dantsker, A., Tang, Q. Y., Noskov, S. and Logothetis, D. E. (2010). "The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2.2 channels." J Neurosci **30**(22): 7554-7562.

Zimmer, J., Kristensen, B. W., Jakobsen, B. and Noraberg, J. (2000). "Excitatory amino acid neurotoxicity and modulation of glutamate receptor expression in organotypic brain slice cultures." Amino Acids **19**(1): 7-21.

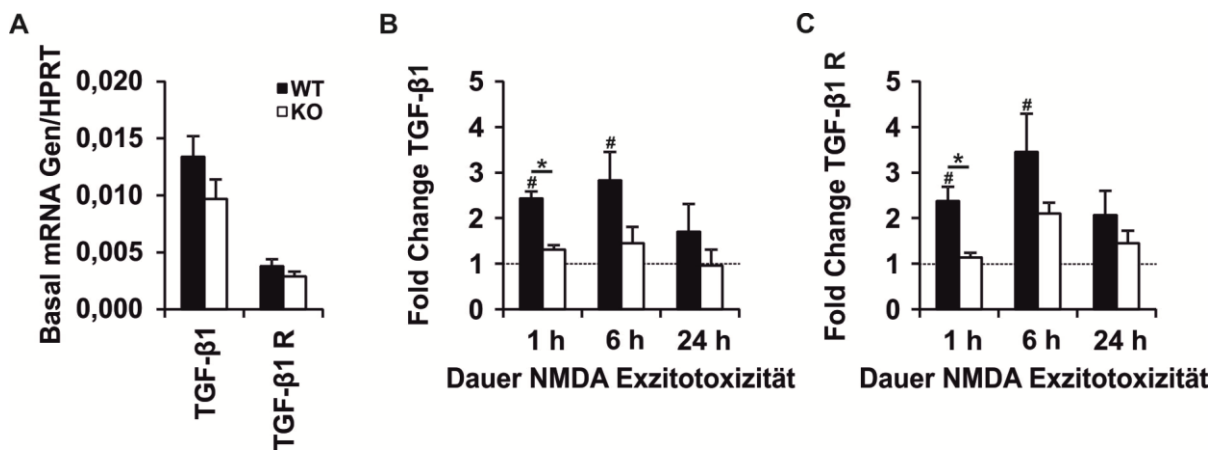


## 8 Anhang

### 8.1 Experimente unter Verwendung von CGC-Kulturen

#### 8.1.1 NMDA-abhängige mRNA-Transkription von TGF- $\beta$ 1 und seinem Rezeptor (TGF- $\beta$ 1 RII)

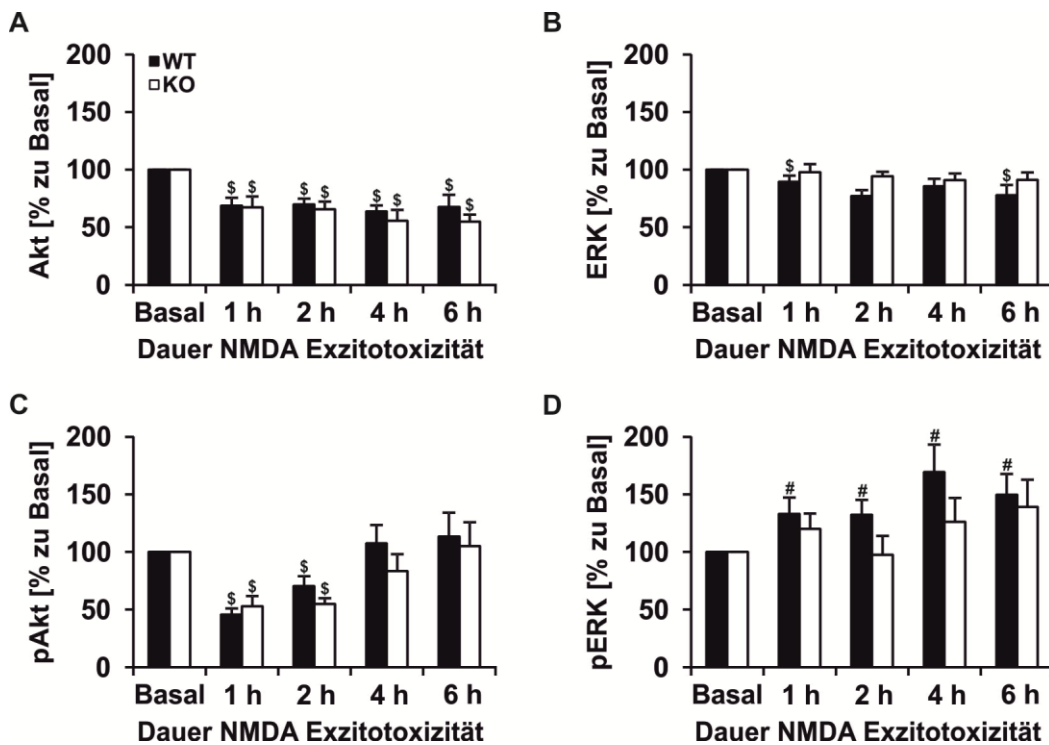
Trotz einiger widersprüchlicher Arbeiten existiert in der Fachliteratur Konsens darüber, dass TGF- $\beta$ 1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zum neuronalen Überleben, v. a im Rahmen exzitotoxischer Schädigungsprozesse, beitragen kann (siehe 1.4) (Prenn et al. 1993, Henrich-Noack et al. 1994, Boche et al. 2003). So wurde bereits mehrfach beschrieben, dass TGF- $\beta$ 1 neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Allerdings wird TGF- $\beta$ 1 hauptsächlich von Gliazellen und nur der korrespondierende Rezeptor von Neuronen exprimiert (König et al. 2005).



**Abbildung 8.1: Expressionsanalyse von TGF- $\beta$ 1 und seinem Rezeptor TGF- $\beta$ 1 RII**

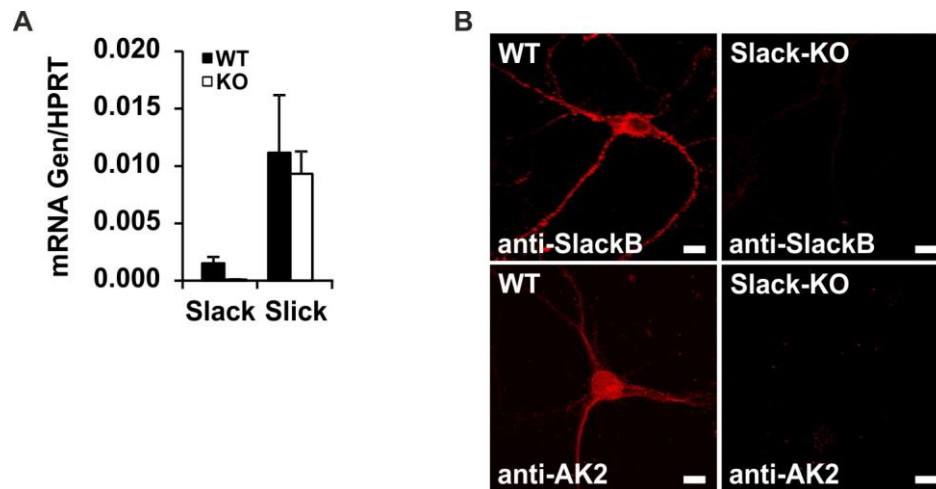
**A** Basale mRNA-Expressionslevel von TGF- $\beta$ 1 und seinem korrespondierenden Rezeptor TGF- $\beta$ 1 RII. **B** und **C** Expressionsrate von TGF- $\beta$ 1 bzw. TGF- $\beta$ 1 RII im Verlauf der NMDA-induzierten Exzitotoxizität. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; WT n=5 und Slack-KO n=5; \*p < 0,05; # steht für die Zunahme (p < 0,05) der Expressionsrate im Vergleich zur basalen Expression).

### 8.1.2 NMDA-abhängige Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK



**Abbildung 8.2: Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK im Verlauf der NMDA-Exzitotoxizität**  
 Änderung der relativen Proteinexpressionslevel von (p)Akt/(p)ERK bezogen auf  $\beta$ -Aktin bei Exzitotoxizität. **A** Während NMDA-induzierter Exzitotoxizität kommt es in Neuronenkulturen beider Genotypen zur signifikanten Abnahme der relativen Akt-Expressionslevel. **B** In WT CGC-Kulturen kann nach 1 h und 6 h NMDA-Exzitotoxizität eine signifikante Abnahme der relativen ERK-Expression im Vergleich zur Basalkontrolle nachgewiesen werden. Nach 2 h und 4 h wird das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht. In Slack-KO Kulturen wird keine Änderung der ERK-Level verzeichnet. **C** Infolge der NMDA-Inkubation kommt es genotypunabhängig zur Abnahme der relativen phospho-Akt-Proteinexpressionslevel. Nachfolgend nehmen die Expressionlevel wieder zu, nach 4 h NMDA wird im WT das Ausgangsniveau erreicht. Insgesamt sind die Expressionslevel im WT nach 2 h, 4 h und 6 h tendenziell höher als im Slack-KO. Die statistische Auswertung ergibt jedoch keine Signifikanzen. **D** Nach NMDA-Zugabe kommt es in WT CGC-Kulturen bereits nach 1 h zu einer signifikanten Zunahme der phospho-ERK-Level. Auch nach 2 h, 4 h und 6 h sind die Proteinexpressionslevel signifikant größer als unter Basalbedingungen. In Slack-KO Kulturen kann keine signifikante Zunahme der pERK-Proteinexpression festgestellt werden. (Es sind Mittelwerte  $\pm$  SEM gezeigt; \* $p < 0,05$ )

## 8.2 Experimente unter Verwendung von primären Hippocampusneuronenkulturen



### Abbildung 8.3: Expression von Slack in primären kultivierten Hippocampusneuronen

Expressionsuntersuchungen wurden an primären Hippocampusneuronenkulturen (PHCN) an DIV 7 durchgeführt. **A** Relative mRNA-Expressionslevel von Slack und Slick bezogen auf HPRT. Keine Slack-mRNA-Expression in Slack-KO PHCN-Kulturen. Slick-mRNA-Level können in WT und Slack-KO PHCNs nachgewiesen werden. Slick-mRNA wird von Slack-KO Kulturen nicht kompensatorisch hochreguliert. **B** IF-Färbungen von WT und Slack-KO PHCNs mittels anti-Slack-B und anti-AK2 Primärantikörper. Keine spezifische Färbung in Slack-KO Neuronen nachweisbar.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

Bausch, A. E., **Ehinger, R.**, Straubinger, J., Zerfass, P., Nann, Y., and Lukowski R. (2018). Loss of Sodium-Activated Potassium Channel Slack and FMRP Differentially Affect Social Behavior in Mice. *Neuroscience* 384: 361-374.

Bausch, A. E., **Dieter, R.**, Nann, Y., Hausmann, M., Meyerdierks, N., Kaczmarek, L. K., Ruth, P., and Lukowski, R. (2015). The sodium-activated potassium channel Slack is required for optimal cognitive flexibility in mice. *Learning & Memory*, 22(7), 323–335.

### Kongressbeiträge

**Rebekka Ehinger**, Anne E. Bausch, Nadine Frank, Katharina Wild, Peter Ruth, Robert Lukowski. "The Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel Slack influences neuronal survival during glutamate receptor-mediated excitotoxicity." Ion Channel Symposium, 24.05. - 25.05.2018 in Copenhagen, Denmark. (*Poster, 1. Posterpreis*)

**Rebekka Dieter**, Anne E. Bausch, Nadine Frank, Katharina Wild, Peter Ruth, Robert Lukowski. "The sodium-activated potassium channel Slack protects neurons against glutamate receptor mediated excitotoxicity". 3<sup>rd</sup> German Pharm-Tox Summit 2018, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 26.02. - 01.03.2018 in Göttingen. (*Poster*)

**Rebekka Dieter**, Anne E. Bausch, Nadine Frank, Katharina Wild, Peter Ruth, Robert Lukowski. "Slack channel mediated neuroprotection against NMDA-induced excitotoxicity". 2<sup>nd</sup> German Pharm-Tox Summit 2017, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 06.03. - 09.03.2017 in Heidelberg. (*Poster*)

Anne E. Bausch, **Rebekka Dieter**, Nora Meyerdierks, Mario Hausmann, Peter Ruth, Robert Lukowski. "Slack channels are implicated in reversal learning and the control of locomotor activity and anxiety". Summer School Tracking fast signalling in processes in vivo - mechanisms, targets and tools, 18.07. - 20.07.2014 in Kloster Frauenchiemsee, Deutschland.

**Rebekka Dieter**, Anne E. Bausch, Nora Meyerdierks, Mario Hausmann, Peter Ruth, Robert Lukowski. "Role of Slack channels in reversal learning tasks, the control of locomotor activity and explorative behavior". 13th International Summer School on Inflammation, Immunomodulation, Inspiration, 27.07. -29.07.2014 in Stein am Rhein, Schweiz. (*Poster*)

