

DIE ROLLE DES  
NATRIUM-CALCIUM-LITHIUM-TRANSPORTERS IN  
DER PATHOPHYSIOLOGIE DER  
AMYOTROPHEN LATERALSCLEROSE

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Thanh Tu Le  
geboren am 21.07.1992 in Meiningen**

**Gutachter:**

- 1. PD Dr. Julian Großkreutz, Jena**
- 2. apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus, Jena**
- 3. Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann, Dresden**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.10.2019**

**Tag des 2. Staatsexamens: 10.-12.10.2017**

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	Die Amyotrophe Lateralsklerose .....	2
2.2	Mutationen des Superoxid Dismutase 1-Gens in der Pathogenese der ALS. 4	
2.3	Selektive Vulnerabilität der Motoneurone und Exzitotoxizität in der Pathogenese der ALS.....	5
2.4	Der ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus und die Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase in der ALS .....	7
2.4.1	Die physiologische Regulation der Calciumhomöostase .....	7
2.4.2	Calciumdysregulationen in der ALS .....	9
2.5	Der Natrium-Calcium-Lithium-Transporter .....	10
2.5.1	Molekulare Eigenschaften des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters .....	10
2.5.2	Funktionen des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters.....	11
2.5.3	Regulation des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters .....	12
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>16</b>
4.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen.....	16
4.2	Tiere.....	21
4.3	Primäre Motoneuron Co-Kulturen .....	22
4.3.1	Vorbereitungen für die Motoneuron Co-Kultur .....	22
4.3.2	Präparation des Rückenmarks und Genotypisierung der Mausembryonen zur Gewinnung von Motoneuronen und Astrozyten .....	22
4.3.3	Isolation und Aussaat von Motoneuronen und Astrozyten .....	24
4.4	NSC34-Kultivierung .....	25
4.5	Western Blot-Verfahren zur Untersuchung des NCLX-Expressionslevels in NSC34-Kulturen.....	26
4.5.1	Behandlung der NSC34-Zellen mit Forskolin und CGP35157 .....	26

4.5.2	Proteinisolation aus den behandelten und nicht behandelten NSC34-Zellen	26
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit NCLX-Antikörper .....	27
4.5.4	Quantifizierung der NCLX-Proteinexpression mittels ImageJ .....	28
4.6	Quantifizierung der Expressionslevel des NCLX-Transporters über immunhistochemische Analyse in Motoneuron Ko-Kulturen .....	28
4.6.1	Immunhistochemische Färbung mit dem NCLX-Antikörper .....	29
4.6.2	Messung der Fluoreszenzintensität des NCLX-Signals mittels Konfokalmikroskopie und ImageJ .....	29
4.7	Überlebensassay zur Untersuchung des Zellüberlebens nach Kainat-induzierter Exzitotoxizität mit und ohne Forskolin/CGP35157 in Motoneuron Ko-Kulturen .....	30
4.7.1	Behandlung der Motoneuron Co-Kulturen mit Kainat, Forskolin und CGP35157 .....	31
4.7.2	Immunhistochemische Färbung mit anti- $\beta$ III-Tubulin und anti-SMI32R.....	31
4.7.3	Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zellüberlebens nach Inkubation mit Kainat, Forskolin oder CGP35157 .....	31
4.8	Intrazelluläre Calciummessungen nach Forskolin-Exposition in Motoneuron Co-Kulturen.....	32
4.8.1	Prinzip der intrazellulären Calcium-Konzentrationsbestimmung .....	32
4.8.2	Experimenteller Aufbau und allgemeiner Ablauf der Calciummessungen....	33
4.8.3	Applikationsprotokolle zur intrazellulären Calciummessung .....	35
4.8.4	Datenprozessierung der erhobenen Calciummessungen .....	37
4.9	Statistische Auswertung.....	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
5.1	NCLX-Expression in der Pathogenese der ALS.....	39
5.2	Modulation der NCLX-Expression durch den Aktivator Forskolin und Inhibitor CGP37157 in der Pathogenese der ALS .....	42
5.2.1	Analyse der 60 kDa-Bande .....	43
5.2.2	Analyse der 100 kDa-Bande .....	44

5.3	Auswirkung von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration unter ruhenden und aktivierten Bedingungen .....	45
5.3.1	Auswirkung von Forskolin auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration unter ruhenden Bedingungen.....	46
5.3.2	Auswirkung des NCLX-Aktivators Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration während einer Zellstimulation mit Kainat .....	50
5.4	Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben in der Pathogenese der ALS.....	56
5.4.1	Einfluss von Kainat auf das neuronale Zellüberleben .....	56
5.4.2	Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben .....	59
5.4.3	Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben nach Kainat-induzierter Exzitotoxizität.....	62
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
6.1	Die Applikation von Forskolin erhöhte die intrazelluläre Calciumkonzentration in Motoneuronen .....	65
6.2	Die Aktivierung oder Inhibition des NCLX-Transporters veränderte nicht das Überleben der Motoneurone .....	68
6.3	In welchem Ausmaß ist die Expression des NCLX-Transporters an den Mitochondrien durch die ALS gestört bzw. verändert?.....	71
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>83</b>
9.1	Ergänzende Abbildungen.....	83
9.2	Tabellenverzeichnis .....	87
9.3	Abbildungsverzeichnis .....	88
9.4	Danksagung.....	90
9.5	Ehrenwörtliche Erklärung .....	92

## **I. Abkürzungsverzeichnis**

%	<i>Prozent</i>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>m</sub>	<i>mitochondriale Calciumkonzentration</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µL	<i>Mikroliter</i>
µm	<i>Mikrometer</i>
µM	<i>Mikromolar</i>
ALS	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>
AMPA-R	<i>α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptor</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
Bcl-2	<i>B-Zell-Lymphoma 2-Proteine</i>
BSA	<i>Rinderserum Albumin</i>
C9ORF72	<i>Chromosome 9 open reading frame 72</i>
CHOP	<i>CCAAT-enhancer binding protein homologous protein</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
CTCF	<i>korrigierte Fluoreszenz der gesamten Zelle, corrected total cell fluorescence</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EGTA	<i>Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure</i>
Em	<i>Emission</i>
ER	<i>Endoplasmatische Retikulum</i>
ERMCC	<i>ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus, ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus</i>
EZL	<i>Extrazellulärlösung</i>
fALS	<i>familiäre ALS</i>
FUS	<i>Fused in sarcoma-Gen</i>
g	<i>Gramm</i>
h	<i>Stunde</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution 1x, Hank's Balanced Salt Solution 1x</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IP3-R	<i>Inositoltriphosphat-Rezeptor</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
Letm1	<i>Calcium-Protonen-Transporter des Mitochondriums</i>
M	<i>Molar</i>
mbar	<i>Millibar</i>
MCU	<i>mitochondrialer Calcium-Uniporter</i>
mg	<i>Milligramm</i>
min	<i>Minuten</i>
mL	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
mM	<i>Millimolar</i>
MN	<i>Motoneuron</i>
mPTP	<i>mitochondriale Permeabilitätspore</i>
ms	<i>Millisekunden</i>
N	<i>Neuron</i>
NCKX	<i>Natrium-Calcium-Kalium-Transporter</i>
NCLX	<i>Natrium-Calcium-Lithium-Transporter</i>
NCX	<i>Natrium-Calcium-Transporter</i>

ng	<i>Nanogramm</i>
NGS	<i>normales Ziegenserum</i>
nm	<i>Nanometer</i>
nMN	<i>Nicht-Motoneuron</i>
PBS	<i>Phosphat gepufferte Salzsäure</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PINK1	<i>PTEN induced kinase 1</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
P <sub>max</sub>	<i>maximaler Peak-Wert</i>
R	<i>350 nm/380 nm-Quotient</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
rpm	<i>Umdrehung pro Minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RyR	<i>Ryanodin-Rezeptor</i>
s	<i>Sekunden</i>
sALS	<i>sporadische ALS</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese</i>
SERCA	<i>Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase</i>
SLP-2	<i>Stomatin like protein 2</i>
SMI32R	<i>anti-Neurofilament H Non-Phosphorylated</i>
SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SOD1	<i>Superoxid-Dismutase 1, Superoxid-Dismutase 1</i>
T	<i>Zeitkonstante</i>
TBS-T	<i>Tris gepufferte Salzsäure mit Tween20</i>
TDP-43	<i>Transactive response DNA binding protein 43 kDa-Gen</i>
V	<i>Volt</i>
VDAC	<i>spannungsgesteuerter Anionenkanal</i>
Δ[Ca <sup>2+</sup> ]	<i>Änderung der zytosolische Calciumkonzentration</i>

# **1 Zusammenfassung**

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist eine progrediente neurodegenerative Erkrankung der Motoneurone (MN). Die resultierende muskuläre Atrophie führt u.a. zu Dysarthrie, Dysphagie, Bewegungsstörungen und respiratorische Insuffizienz. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt 3-5 Jahre. Zu den pathogenetischen Faktoren der Erkrankung zählt die Calciumdysregulation mit mitochondrialer Calciumüberladung, die zur Apoptose führt. Die Ursache könnte eine gestörte Calciumelimination aus Mitochondrien sein, die in Neuronen durch den Natrium-Calcium-Lithium-Transporter (NCLX) gesteuert wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des NCLX in der Pathogenese der ALS zu untersuchen. Dazu wurden primäre MN Co-Kulturen (MN-Kultur) und NSC34-Zellen genutzt, die die ALS typische Mutation hSOD1G93A exprimierten.

Die **Messung der intrazellulären Calciumkonzentration** unter Applikation von Forskolin als Aktivator des NCLX ergab eine unterschiedliche Reaktion zwischen hSOD1G93A MN und MN der gesunden Kontrollgruppe. Eine Applikation von Forskolin während einer Zellaktivierung führte zu keinen Unterschieden in der Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Inkubation von primären MN mit Forskolin, CGP37157 als NCLX-Inhibitor oder einer Kombination aus Kainat und jeweils einer der Substanzen konnte keine Verbesserung des **Zellüberlebens** unter basalen Bedingungen und Kainat-induzierter Exzitotoxizität nachweisen. Die immunhistochemische Analyse der **NCLX-Lokalisation** in MN zeigte ein NCLX-Signal in den Zellsomata und -Fortsätzen, was mit einer mitochondrialen Lokalisation vereinbar ist. Die Quantifizierung der NCLX-Expression ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen hSOD1G93A MN im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Messung der **NCLX-Expression** mithilfe des Western Blot-Verfahrens in NSC34-Zellen wurde die Existenz von zwei Isoformen mit einer Proteidlänge von 60 kDa und 100 kDa nachgewiesen, wobei sich eine signifikant erniedrigte Expression beider NCLX-Isoformen im ALS-Modell zeigte. Eine Behandlung mit Forskolin oder CGP37157 konnte die NCLX-Expression der 60 kDa-Isoform signifikant erhöhen, während sich die 100 kDa-Isoform nur nach Forskolin-Behandlung verstärkte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren eine Rolle des NCLX in der Pathogenese der ALS, die es in weiteren Studien genauer zu analysieren gilt.



## 2 Einleitung

### 2.1 Die Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), auch Motoneuron-Erkrankung oder Lou Gehring-Erkrankung, ist eine letale, neurodegenerative Erkrankung, die durch einen progressiven Untergang des ersten und zweiten Motoneurons (MN) gekennzeichnet ist. Durch die fehlende Innervation kommt es zur Atrophie der Skelettmuskulatur, was sich klinisch in zwei Phenotypen widerspiegelt. Der bulbäre Phänotyp einerseits geht vor allem mit Dysarthrie und Dysphagie einher. Der spinale Phänotyp andererseits äußert sich durch Koordinationsstörungen und Muskelschwäche in den Extremitäten. Je nach langsam oder schnell progredienter Form verlieren die PatientenInnen rasch ihre Mobilität und die damit verbundene Autonomie. Der lebenslimitierende Faktor ist in den meisten Fällen eine respiratorische Insuffizienz. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach der Diagnosestellung liegt bei 3-5 Jahren.

Bisher existiert keine kurative Behandlung der ALS, weshalb die symptomatische Therapie, z.B. mit Ernährungsmaßnahmen, Sauerstoffversorgung oder Hilfsmitteln zur Förderung der Mobilität und Kommunikation, im Vordergrund steht. *Riluzol* ist das einzig für ALS zugelassene Medikament, welches das Überleben der Betroffenen um wenige Monate verlängert (Bensimon et al. 1994, Lacomblez et al. 1996).

Die Grundlage einer effektiven Forschung an wirksamen Medikamenten für die ALS ist ein umfangreiches pathogenetisches Verständnis. So können kausale Faktoren identifiziert und Möglichkeiten der Beeinflussung entwickelt werden, um die Degeneration von MN zu verhindern und das Überleben der ALS-PatientInnen zu verlängern. ALS entsteht aus einer multifaktoriellen Pathogenese (Abbildung 1). Bei dem Großteil der Patienten (90 %) sind keine eindeutigen genetischen Ursachen nachzuweisen. Sie gehören zur Gruppe der sporadischen ALS (sALS). In 10 % der Fälle lassen sich charakteristische Mutationen identifizieren, sodass diese als familiäre ALS (fALS) bezeichnet werden.



Manfredi 2010, Lautenschlager et al. 2013, Bilisland et al. 2008, Grosskreutz et al. 2010). Da die mit ALS assoziierten Mutationen in allen Zellen vorliegen und jüngere Forschungsergebnisse zunehmend Hinweise für Veränderungen im Immunsystem und eine Beeinträchtigung im Bereich frontotemporaler Funktionen lieferten, wird die ALS heute als systemische Erkrankung betrachtet.

Weshalb das klinische Bild vorrangig vom Ausfall der MN dominiert wird, scheint an ihrer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Calciumdysregulationen zu liegen (Grosskreutz et al. 2010, Shaw 2005). Zahlreiche zelluläre Prozesse sind Calcium abhängig und verschiedenste Signalwege werden über Calcium als *second messenger* miteinander koordiniert. Eine regelrechte Calciumhomöostase, die durch den ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus (ERMCC) reguliert wird, ist daher essenziell für das Überleben einer Zelle. Die Calciumdysregulation in MN, im Sinne einer Calciumdepletion im ER und einer Calciumüberladung in Mitochondrien, ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der ALS und bildet möglicherweise den zentralen Knotenpunkt, der die vielen pathologischen Phänomene verbindet. Doch welche Ursachen genau zum entgleisten Calciumhaushalt in MN führen, ist bisher unklar. Mitochondrien können große Mengen Calcium speichern und spielen eine herausragende Rolle bei der Erhaltung der Calciumhomöostase. Denkbar wäre eine gestörte mitochondriale Calciumelimination, die eine Überladung in der Matrix begründet. In erregbaren Zellen wird der mitochondriale Calciumausstrom hauptsächlich durch den Natrium-Calcium-Lithium-Transporter (NCLX) vermittelt. Immer wieder wird seine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Calciumhomöostase betont. Die molekulare Entdeckung des NCLX ist knapp 13 Jahre her und doch ist seine Rolle in der Pathogenese der ALS nur wenig beleuchtet worden. Er soll daher zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

## **2.2 Mutationen des Superoxid Dismutase 1-Gens in der Pathogenese der ALS**

Superoxid Dismutase 1 (SOD1) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein und Teil des antioxidativen Systems. SOD1 katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Ionen in Sauerstoff und Hydrogenperoxid und ist vorrangig im Zytosol aktiv. Eine zweite Isoform konnte im Intermembranraum von Mitochondrien nachgewiesen werden (Sturtz et al. 2001). Bisher sind über 150 verschiedene Mutationen des SOD1-Gens bekannt, die

mit ALS assoziiert werden und etwa 20 % aller fALS-Fälle ausmachen (Battistini et al. 2005, Finsterer und Burgunder 2014).

Die genauen pathogenetischen Mechanismen, die die SOD1-Mutationen mit dem Zelluntergang verbinden, sind noch Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Diese beschäftigen sich einerseits mit der Hypothese der sog. hypermorphen Mutation (*gain of function* Mutation), die u.a. zu ER-Stress und mitochondrialer Dysfunktion beitragen. Andererseits wird die Theorie der Funktionsverlustmutation (*loss of function*) untersucht, die die Ausbildung von oxidativem Stress durch einen Ausfall des SOD1-Gens postuliert. Möglicherweise führen SOD1-Mutationen sowohl zu einer erhöhten als auch erniedrigten Aktivität, deren Auswirkungen sich gegenseitig verstärken (Saccon et al. 2013). Im ALS-Mausmodell konnten Aggregationen mutierter SOD1-Proteine in der Matrix von spinalen Neuronen nachgewiesen werden (Vijayvergiya et al. 2005). Diese können beispielsweise mit Transportern der mitochondrialen Membran, möglicherweise auch mit dem NCLX, oder dem Komplex IV der Atmungskette interagieren und deren Funktion stören. Im Einklang mit der Hypothese, ALS sei eine nicht-zellautonome Erkrankung, wirken sich SOD1-Mutationen sowohl auf die Zellprozesse von MN als auch auf gliale Funktionen aus. Gliazellen beeinflussen ihrerseits wiederum die Funktionen in MN (Ferri et al. 2006, Kawamata und Manfredi 2010).

### **2.3 Selektive Vulnerabilität der Motoneurone und Exzitotoxizität in der Pathogenese der ALS**

Trotz der ubiquitären Expression der ALS-assoziierten Mutationen sind interessanterweise vorrangig MN von der Neurodegeneration infolge der Calciumdysregulation betroffen. MN weisen drei Merkmale auf, die diese erhöhte Vulnerabilität erklären:

- 1.) MN exprimieren eine geringere mRNA-Konzentration der Glutamat-Rezeptor 2-Untereinheit des  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptors (AMPA-R), die in anderen Neuronen die *Calciumundurchlässigkeit* der AMPA-R ausmachen (Van Damme et al. 2002).
- 2.) MN exprimieren eine höhere Dichte dieser Calcium-permeablen AMPA-R (Carriedo et al. 1996, Corona und Tapia 2007). So steigt bei einer Zellaktivierung über den AMPA-R die intrazelluläre Calciumkonzentration

stärker an und effektive Mechanismen der Calciumelimination werden gebraucht, um die Ruhekonzentration wieder herzustellen.

- 3.) MN weisen im Vergleich zu anderen Neuronen eine geringere Konzentration an zytosolischen Calcium-bindenden Proteinen auf, wie beispielsweise Parvalbumin oder Calbindin-D28K (Alexianu et al. 1994); (Palecek et al. 1999). Folglich sind für den Erhalt der Calciumhomöostase zusätzliche Systeme, wie ER und Mitochondrien notwendig. Letztere sind nicht nur Speicherorganellen für große Calciummengen, sondern auch Energielieferanten zur Gewährleistung Adenosintriphosphat-abhängiger (ATP) Prozesse in der Calciumelimination.

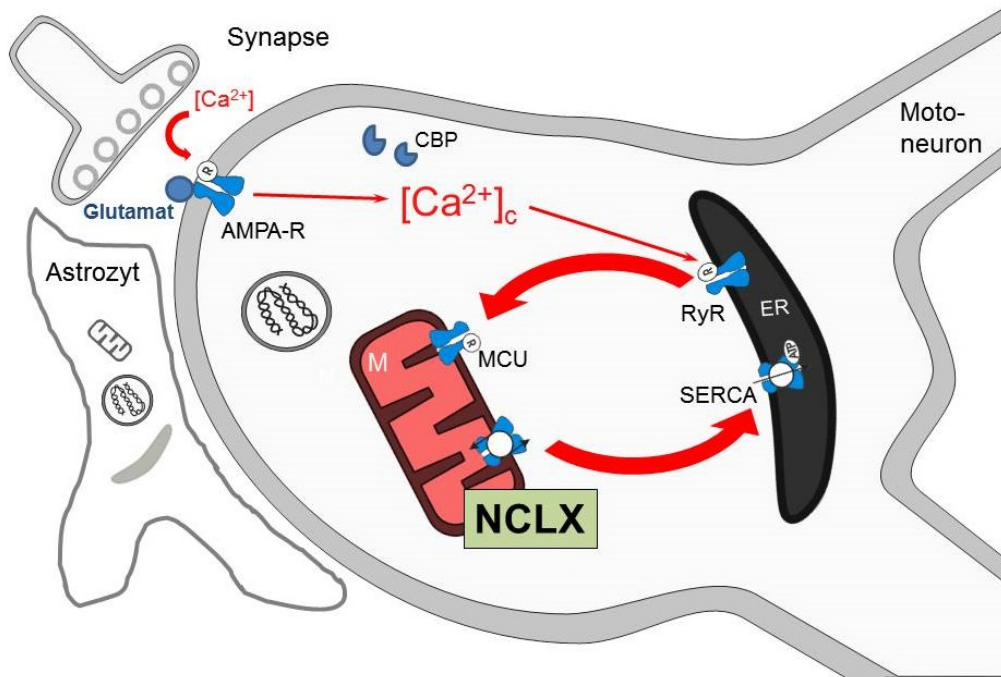
MN sind somit höheren Calciumkonzentrationen ausgesetzt, besitzen aber eine geringere Kapazität an zytosolischen Calcium-bindenden Proteinen, die zur Erhaltung der Calciumhomöostase beitragen könnten. Diese Eigenschaften machen die Calciumregulation zu einem störanfälligen Prozess und MN besonders vulnerabel gegenüber intrazellulärer Calciumüberladung. Den Mitochondrien kommen bei der Regulation des Calciumhaushalts eine besondere Rolle zu. Nach AMPA-R-Stimulation in MN steigt die mitochondriale Calciumkonzentration stärker an und erzeugt einen höheren oxidativen Stress im Vergleich zu Nicht-MN (Joshi et al. 2015). Kommen zusätzliche pathologische Faktoren hinzu, die die physiologisch bereits vollbelastete Calciumregulation aus dem Gleichgewicht bringen, können exzitatorische Stimulationen mit folgenden massiven Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentration toxische Effekte induzieren. Dieser Zusammenhang wird als Exzitotoxizität bezeichnet und gilt als ausschlaggebender Faktor in der Pathogenese der ALS (Grosskreutz et al. 2010, Choi 1985, Netzahualcoyotzi und Tapia 2015). Eine chronische intrazelluläre Calciumüberladung führt durch Induktion von oxidativem Stress, Dysregulation Calcium-abhängiger Zellprozesse und Organelldysfunktionen schließlich zur Degeneration der MN (Joshi et al. 2015, Tymianski et al. 1993, Carriedo et al. 2000). Zur Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten muss die Frage nach den molekularen Ursachen, die für die chronische Calciumüberladung in MN bei der ALS verantwortlich sind, beantwortet werden. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Rolle des NCLX als mitochondrialer Calcium-Austauscher und potenzieller pathogenetischer Faktor innerhalb des ERMCC analysiert werden.

## **2.4 Der ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus und die Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase in der ALS**

### **2.4.1 Die physiologische Regulation der Calciumhomöostase**

Bei einer Aktivierung der MN, die über die Bindung von Glutamat am AMPA-R vermittelt wird, öffnen sich diese Ionenkanäle und lassen Calcium in das Zytoplasma strömen. Um hohe intrazelluläre Calciumkonzentration zu erreichen und untergeordnete Signalkaskaden zu induzieren, werden neben exogenem Calcium auch endogene Calcium-Ionen aus dem ER freigesetzt, die über die Bindung von Calcium an den endoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor (RyR) vermittelt werden. Der schnelle, massive Calciumanstieg bedarf einer ebenso schnellen Regeneration, um die Signalkaskade zu limitieren und die Zelle in einen wieder aktivierbaren Zustand zu versetzen. Dazu nehmen Mitochondrien (Werth und Thayer 1994, White und Reynolds 1995, Drago et al. 2012) schnell große Mengen Calcium über spannungsgesteuerte Anionenkanäle (VDAC) sowie den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) auf und geben diese langsam über den NCLX wieder ab. Calcium kann dann über die Sarkoplasmatische/Endoplasmatische Reticulum Calcium-ATPase (SERCA) wieder in das ER zurückgeführt oder über membranständige Calciumtransporter aus der Zelle entfernt werden. Dieser rege Calciumaustausch zwischen ER und Mitochondrien wird ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus (ERMCC) genannt (Murgia et al. 2009, Ishii et al. 2006, Grosskreutz et al. 2007) und reguliert physiologisch die intrazelluläre Calciumkonzentration (Abbildung 2).

Der Calciumeinstrom in Mitochondrien über VDAC und MCU wird durch mikromolare Calciumkonzentrationen (Ruhekonzentration etwa 100 nM) aktiviert (Szabadkai und Duchon 2008, Baughman et al. 2011), die in begrenzten Regionen innerhalb des Zytosols, in sog. Calciummikrodomänen entstehen (Giacomello et al. 2010).



**Abbildung 2:** Der ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus.

Bei einer Aktivierung des Motoneurons durch Glutamatbindung an den Aminomethylphosphonsäure-Rezeptor (AMPA-R) strömt Calcium in die Zelle und induziert am Ryanodin-Rezeptor (RyR) eine Entleerung des Calciumspeichers aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). So kann rasch eine massive Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) erreicht werden und nachfolgende Signalkaskaden aktivieren. Zur Wiederherstellung der Calciumruhekonzentration wird Calcium durch Calcium-bindende Proteine (CBP) gepuffert, größtenteils aber über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (MCU) in Mitochondrien (M) gespeichert. Calcium kann später langsam über den mitochondrialen Natrium-Calcium-Lithium-Transporter (NCLX) zurück ins Zytoplasma eliminiert werden, von wo es über Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches Reticulum Calcium-ATPasen (SERCA) wieder vom ER aufgenommen werden kann (modifiziert nach (Lautenschlager et al. 2013)).

Dazu sind Mitochondrien strategisch sehr günstig in der Nähe von ER, Glutamat-Rezeptoren und Calciumkanälen der Plasmamembran lokalisiert (Rizzuto et al. 1993). Die enorme Pufferkapazität der Mitochondrien begründet sich in der Bildung unlöslicher Calcium-Phosphat-Komplexe, die die freie mitochondriale Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_m$ ) nach initialem Anstieg auf einem Plateau von 1-2  $\mu\text{M}$  stabil hält (David et al. 2003, Nicholls und Chalmers 2004). Zusätzlich liegen mitochondriale Calcium-bindende Proteine und nicht-proteinäre Calciumpuffersysteme vor (Adam-Vizi und Starkov 2010).

Die mitochondriale Calciumaufnahme dient nicht nur der Pufferung zytosolischer Calciumkonzentrationen. Die steigende  $[Ca^{2+}]_m$  beeinflusst auch mitochondriale Funktionen. So agiert Calcium z.B. als Sensor des metabolischen Energieverbrauchs und steigert die Aktivität Calcium sensibler Schlüsselenzyme des Citratzykluses sowie Dehydrogenasen der oxidativen Phosphorylierung und folglich die Energieproduktion

der Zelle (Duchen 2012, Castaldo et al. 2009, Gleichmann und Mattson 2011, McCormack und Denton 1990).

#### 2.4.2 Calciumdysregulationen in der ALS

Dieses fragile Calcium-regulierende System, der ERMCC, ist in MN der ALS gestört. Berridge *et al.* postulierte eine Verschiebung des Calcium im Sinne einer Calciumdepletion im ER und einer Calciumüberladung in Mitochondrien (Berridge 2002), wobei bisher die erhöhten mitochondrialen Calciumkonzentrationen nachgewiesen werden konnten (Siklos et al. 1996).

Dies kann als Folge exzitotoxischer Stimuli und der darauffolgenden zytosolischen Calciumüberladung erklärt werden, die über den RyR zur Calciumsekretion aus dem ER und über den MCU zur Calciumaufnahme in die Mitochondrien induziert. Resultate dieser Verschiebung sind ER-Stress und mitochondriale Dysfunktion (Grosskreutz et al. 2010, Kawamata und Manfredi 2010, Cozzolino und Carri 2012).

ER-Stress als Konsequenz einer Dysregulation des Calciums im ER-Lumen bezeichnet eine gestörte Proteinfaltung, die zunächst einen Kompensationsmechanismus aktiviert, der *unfolded protein response* genannt wird. Wenn die Situation dadurch nicht deeskaliert, werden Caspase 12 und *CCAAT-enhancer binding protein homologous proteins* (CHOP) aktiviert, sodass folgend die Konzentration aktiver pro-apoptotischer B-Zell Lymphoma 2-Proteine (Bcl-2) ansteigt und den programmierten Zelltod induziert (Prell et al. 2013).

Im hSOD1G93A-Modell wurde eine größere mitochondriale Depolarisation nach Zellstimulation im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Diese verstärkte sich im Spätstadium und wies zusätzlich eine verzögerte Regeneration auf (Nguyen et al. 2009). Ein Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials sowie ein Anstieg des pH-Wertes kann auf eine überschrittene Calcium-Pufferkapazität zurückgeführt werden, sodass  $[Ca^{2+}]_m$  stetig ansteigt (Szabadkai und Duchen 2008, Thayer und Miller 1990). Ein chronisches Überangebot an Calcium ruft über die Stimulation der oxidativen Phosphorylierung eine Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hervor (Gleichmann und Mattson 2011). Sowohl die erhöhte Calciumkonzentration als auch die ROS-Produktion kann die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (mPTP) induzieren, da Cyclophilin D, als Teil des mPTP, Calcium-sensitiv ist. Darüber strömt nicht nur Calcium zurück ins Zytosol, auch andere



mitochondriale Ionen und Proteine, wie etwa Cytochrom C werden freigesetzt, was nachfolgend die Apoptose initiiert (Szabadkai und Duchon 2008). Cytochrome C bindet außerdem an Inositoltriphosphat-Rezeptoren (IP3-R) des ER und löst so eine Ausschüttung der ER-Calciumspeicher aus, was wiederum weitere Mitochondrien zur Cytochrom C-Freisetzung veranlassen kann (Boehning et al. 2003).

Die dysregulierte Calciumhomoöstase führt schließlich zur selektiven Neurodegeneration des ersten und zweiten MN. Werden die Skelettmuskeln nicht mehr adäquat innerviert, kommt es zur fortschreitenden Muskelatrophie und Verschlechterung der Motorik von ALS-PatientInnen. Mitochondrien sind wichtige Calciumregulatoren im ERMCC. Der NCLX als Calcium-eliminierender Transporter nimmt sowohl auf mitochondriale als auch auf zytosolische Calciumkonzentrationen Einfluss. Störungen seines Expressionsmusters oder seiner Funktionalität können große Auswirkungen auf das gesamte System haben.

## **2.5 Der Natrium-Calcium-Lithium-Transporter**

### **2.5.1 Molekulare Eigenschaften des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters**

Gründe für die in ALS nachgewiesene mitochondriale Calciumüberladung können in einer gestörten Calciumaufnahme oder –Abgabe liegen. Letztes ist möglicherweise ein wichtiger pathogenetischer Faktor in der ALS, was bisher nur unzureichend untersucht wurde. Hinweise für eine Störung bei der mitochondrialen Calciumelimination liefert eine Studie, bei der nicht-transgene MN und solche mit hSOD1G93A-Mutation unterschiedlich auf eine Zellstimulation reagieren, wenn der NCLX blockiert wurde (Joshi et al. 2015, Lautenschlager et al. 2013).

Der Calcium-Protonen-Transporter (Letm1) (Jiang et al. 2009), kurze Öffnungen des mPTP und die Natrium-Calcium-Transporter 2 (NCX2) und 3 (NCX3), die üblicherweise in der Plasmamembran exprimiert sind (Scorziello et al. 2013, Wood-Kaczmar et al. 2013) tragen in geringerem Maße zum mitochondrialen Calciumausstrom bei. Darüber hinaus scheint auch der MCU über eine Umkehr der Transportrichtung eine Rolle bei der mitochondrialen Calciumelimination zu spielen, der vor allem bei Calciumüberladung zum Tragen kommt (Montero et al. 2001). Der wichtigste Akteur der Calciumelimination aus Mitochondrien in erregbaren Zellen ist allerdings der Natrium-Calcium-Lithium-Transporter (NCLX) (Palty et al. 2010).

Der NCLX ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und zeichnet sich durch einen Natrium-abhängigen Calciumaustausch aus. Er ist, anders als die bisher bekannten Natrium-Calcium-Transporter, für Kalium impermeabel, jedoch für Lithium durchlässig, welches Natrium ersetzen kann (Palty et al. 2004). Eine weitere Forschungsgruppe wies zudem auch eine Lokalisation des NCLX in der Plasmamembran nach (Cai und Lytton 2004). Die NCLX-Expression wird durch das FJL22233-Gen kodiert und ist besonders im Gehirn und in der Skelettmuskulatur hoch. Das Protein besteht aus 13 Transmembrandomänen und zwei  $\alpha$ -Repeat-Domänen ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ). Seine Funktionalität erreicht der Rezeptor durch eine Oligomerisierung dieser  $\alpha$ -Domänen. Bisher sind drei Isoformen mit einer Proteinelänge von ca. 50 kDa, 70 kDa und 100 kDa bekannt (Palty et al. 2010). Untersuchungen zur Stöchiometrie des NCLX weisen kontroverse Ergebnisse auf. Überwiegend wird die Annahme eines elektrogenen Austausches von drei Natrium-Ionen für ein Calcium-Ion vertreten (Boyman et al. 2013).

Durch die zuvor fälschlicherweise postulierte Zugehörigkeit des NCLX zu bereits bekannten Natrium-Calcium-Transporter-Familien, wie der *Soluble Carrier-Familie 8* (SLC8 oder NCX) oder *SLC24* (Natrium-Calcium-Kalium-Transporter, NCKX) finden sich Synonyme wie *SLC8B1* und *SLC24A6*. Der NCLX unterscheidet sich allerdings essenziell von diesen Transporter-Subklassen, sodass er heute als erstes Mitglied einer neuen Natrium-Calcium-Transporter-Familie angesehen wird. So lässt er sich nicht durch bekannte NCX/NCKX-Inhibitoren hemmen und seine kurze Isoform zeigt weiterhin Aktivität, während die der NCX/NCKX inaktiv ist. Lithium blockiert außerdem diese Transporter, für den NCLX ist Lithium dagegen permeabel (Palty et al. 2010).

## 2.5.2 Funktionen des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters

Die wichtige Funktion übernimmt der NCLX bei der Elimination von Calcium aus Mitochondrien in erregbaren Zellen. Im Gegensatz dazu spielt der Letm1 in nicht-erregbaren Zellen die Hauptrolle der Calciumelimination (De Marchi et al. 2014). Der NCLX reguliert somit sowohl die mitochondriale als auch die zytosolische Calciumkonzentration und die damit verbundenen Zellprozesse.

In B-Lymphozyten konnten Hinweise für eine Beeinflussung des NCLX auf die Wiederauffüllung des ER-Calciumspeichers beobachtet werden (Kim et al. 2012). Weitere Studien deuten auf eine Rolle des NCLX bei der Direktion des aus

Mitochondrien eliminieren Calciums durch Interaktion mit IP3-R, plasmamembranständigen Calcium-Transportern und den Vorgängen des sog. *calcium operated calcium entry* (SOCE) hin. Wurde z.B. die zytosolische Calciumelevation durch eine Entleerung der ER-Calciumspeicher induziert, so wird Calcium von den Mitochondrien wieder zum ER zurückgeführt. Unter toxischen Glutamat-Konzentrationen wiederum wird eine Wiederaufnahme des Calciums über den MCU beobachtet. Es folgt dann erneut eine Elimination über den NCLX, sodass ein mitochondrialer Calciumkreislauf entsteht (Castaldo et al. 2009). Dem NCLX wird zudem ein Einfluss auf die posttetanische Potenzierung zugeschrieben. Durch einen verzögerten, langsamen Calciumausstrom werden hohe zytosolische Calciumkonzentrationen über die Dauer der tatsächlichen Stimulation hinaus aufrecht erhalten (Castaldo et al. 2009). In Astrozyten konnten Parnis *et al.* u.a. eine Störung der Exozytose und Zellproliferation unter NCLX-Suppression nachweisen (Parnis et al. 2013). Eine andere aktuelle Studie schrieb dem NCLX eine Schlüsselrolle bei der Schrittmacher-Funktion von Kardiomyozyten zu (Takeuchi et al. 2013). In der Ausbildung von neuronalen Netzwerken scheint der NCLX gleichermaßen eine essenzielle Bedeutung zu haben (Sharma et al. 2017).

### 2.5.3 Regulation des Natrium-Calcium-Lithium-Transporters

Die Aktivität des NCLX kann durch verschiedene Ionen beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Aktivität wird durch eine höhere Kalium- und Natrium-Konzentration im Zytosol erreicht, eine Inhibition durch hohe Konzentrationen an Nickel-, Magnesium-, Barium- und Lanthan-Ionen. Der optimale pH-Wert liegt bei 7,5-7,6. (Palty und Sekler 2012).

Des Weiteren wird der NCLX durch *PTEN induced putative kinase 1* (PINK1) moduliert, einer Struktur in der äußeren mitochondrialen Membran, die über Parkin-Rekrutierung Teil des mitochondrialen Kontrollsystems ist. PINK1 erhöht die NCLX-Aktivität auf einer molekularen Ebene (Gandhi et al. 2009). Eine andere Studie zeigte eine positive Interaktion zwischen NCLX und der Proteinkinase C (Yang et al. 2003). Eine Steigerung der mitochondrialen Calciumelimination konnte ebenso mit Forskolin erzielt werden. Forskolin ist ein Aktivator der Proteinkinase A (PKA), die wiederum die Aktivität des NCLX durch Phosphorylierung verstärkt (Kostic et al. 2015). Aus diesem

Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit Forskolin zur Induktion der NCLX-Aktivität eingesetzt.

Das *Stomatin like protein 2* (SLP-2) wird hingegen als NCLX-Inhibitor beschrieben. In HeLa-Zellen mit SLP-2-Überexpression wurden nach Stimulation mit Histamin ein erniedrigter zytosolischer Calciumanstieg, ein höherer mitochondrialer Calciumanstieg und ein verminderter mitochondrialer Calciumausstrom gemessen (Da Cruz et al. 2010). Zur direkten Inhibition des NCLX kommen außerdem einige Benzodiazepine in Frage, wobei CGP37157 (Cox et al. 1993) der effektivste und spezifischste ist (Ruiz et al. 2014). Allerdings hemmt er auch andere Rezeptoren, wie die SERCA, den RyR in gestreiften Muskelzellen (Neumann, Diaz-Sylvester, Fleischer, & Copello, 2011) oder NCX der Plasmamembran, wenngleich nur partiell und erst bei 10-fach höherer Konzentration (Palty und Sekler 2012, Cox et al. 1993). CGP37157 wurde daher in einigen Experimenten dieser Dissertation als Inhibitor des NCLX verwendet.

Bei fehlender Expression bzw. pharmakologische Hemmung der NCLX-Aktivität konnte in den oben genannten Studien eine Störung entsprechender Zellprozesse beobachtet werden. Auf molekularer Ebene würde eine verminderte NCLX-Aktivität eine verringerte Calciumelimination aus Mitochondrien bedeuten. Calcium kann nicht mehr für die Wiederauffüllung der ER-Speicher genutzt werden und die Wiederherstellung der Ruhekonzentration sowohl im ER-Lumen als auch im Zytoplasma wäre beeinträchtigt. Die veränderte Calciumkonzentration führt zu Störungen in den zahlreichen Calcium-abhängigen Prozessen, wie bei der Proteinfaltung oder beim mitochondrialen Transport. Ein gehemmter Calciumausstrom bedeutet weiterhin eine chronisch hohe Calciumkonzentration in der Matrix. Die stetige Induktion der oxidativen Phosphorylierung steigert die Produktion von ROS, was zum oxidativen Stress führt. Akkumuliert Calcium weiterhin, sinkt das mitochondriale Membranpotenzial soweit ab, bis Mitochondrien ihre ATP-Produktion nicht mehr aufrechterhalten können. Eine mangelhafte Energiebereitstellung sowie die durch hohe Calciumkonzentrationen ausgelöste Öffnung der mPTP können schließlich zur Zelldegeneration führen.

Aufgrund der Vielzahl der involvierten Mechanismen ist eine gestörte NCLX-Funktion bei den neurodegenerativen Prozessen in der Pathogenese der ALS denkbar. Als Haupteliminationsweg für Calcium aus Mitochondrien übernimmt er eine wichtige Aufgabe bei der Modulation zytosolischer und mitochondrialer

Calciumkonzentrationen. Die Analyse seiner Rolle in ALS ist daher Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

### 3 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der **Rolle des mitochondrialen NCLX** in der Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose. Die geplanten Projekte konzentrierten sich dabei auf Expressionsanalysen und die Untersuchung der funktionellen Bedeutung auf Ebene des intrazellulären Calciumlevels und des Überlebens der MN unter Modulation des NCLX durch Verwendung von Agonisten und Inhibitoren. Der ERMCC spielt bei der Pathogenese der ALS eine entscheidende Rolle und ist durch eine Veränderung der Calciumkonzentration im endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien gekennzeichnet. Ein entscheidender Schritt bei der Regulation der Calciumhomöostase ist der Transport von Calcium aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dieser kontinuierliche Abtransport erfolgt mit Hilfe des NCLX.

Aufbauend auf diese Sachkenntnis wurde für die vorliegende Arbeit folgende Hypothese postuliert: Die Aktivierung des NCLX steigert den Abtransport von mitochondrial lokalisiertem Calcium und führt zu einer Abnahme pathogenetischer Calciumlevel bei ALS. Diese Abnahme bedingt ein verbessertes Überleben spinaler Neurone, im Besonderen das der MN. Zur Bearbeitung der Projekte ergeben sich folgende Fragen:

- ***In welchem Ausmaß ist die Expression des NCLX-Transporters in den Mitochondrien durch die ALS gestört bzw. verändert?***
- ***In welchem Ausmaß verändert die Applikation von NCLX-Agonisten und -Inhibitoren die intrazellulären Calciumkonzentrationen?***
- ***Verändert die Aktivierung oder Inhibition des NCLX-Transporters das Überleben der Motoneurone?***

Für die Beantwortung der Fragen werden gezielt primäre MN Co-Kulturen von hSOD1G93A-Mäusen genutzt. Dieses Mausmodell spiegelt essentielle Signalwege der ALS-Erkrankung wider (Rosen et al. 1993).

Diese Arbeit soll damit zum tieferen Verständnis der pathogenetischen Prozesse der ALS beitragen und pathologische Faktoren identifizieren, die zur Degeneration von MN führen. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

## **4 Materialien und Methoden**

### **4.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen**

Die Tabellen 3-5 listen unter Angabe des Herstellers alle verwendeten Materialien, Geräte sowie Chemikalien auf und beschreiben die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

**Tabelle 1:** Verwendete Materialien und Geräte mit Herstellerangaben

Materialien und Geräte	Hersteller
24-Wellplatte	Nunc Surface Plates Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BIO-RAD Equipment (Western Blot)	Hercules, CA, USA
CCD-Kamera iXON+ (Calcium imaging)	ANDOR, Belfast, UK
Deckgläser (12 mm Durchmesser)	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
dichroischer Spiegel DCLP410 (Calcium imaging)	TillPhotonics, Gräfelfing, Deutschland)
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Emmissionsfilter LP440 (Calcium imaging)	TillPhotonics, Gräfelfing, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit 20x Objektiv	Axioplan 2 imaging, Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop mit 40x Wasserimmersionsobjektiv	Nikon Microscope Eclipse FN1, Tokyo, Japan
Kanülen (0,4 mm Durchmesser)	Sterican Braun, Deutschland
Konfokalmikroskop Laser Scanner Mikroscope 510	Zeiss, Jena, Deutschland
Kulturflaschen (5 mL, 20 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Monochromator Polychrome V (Calcium imaging)	TillPhotonics, Gräfelfing, Deutschland
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm <sup>2</sup> )	Assistent, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, USA
Polyimid Applikator-Spitzen (Calcium imaging)	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Reglo Z-Pumpe (Calcium imaging)	ismatech, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

**Tabelle 2:** Verwendete Chemikalien mit Konzentrations- und Herstellerangaben



Chemikalien	Konzentration	Hersteller
Agarosegel	1,5 %ig	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Alexa 488	1:200	life technologies, USA
Alexa 594	1:200	life technologies, USA
anti-Neurofilament H Non-Phosphorylated (SMI32R)	1:1000	COVANCE, USA
anti- $\beta$ -Actin	1:630 in 5 %igem Milchpulver	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
anti- $\beta$ III-tubulin rabbit anti-mouse	1:250	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Arabinofuranosyl-Cytidin- Säure (AraC)	500 $\mu$ M	Calbiochem, San Diego, CA, USA
CGP37157	5 $\mu$ M	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Clarify Western ECL Blotting Substrate Kit		BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Control Precision Strep Tracking HRP		BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,01 %ig	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNase I	2 mg/mL in 0,9 %igem Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Doxycyclin	2 $\mu$ g/mL	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Fluoromount-G		SouthernBiotech, USA
Forskolin	100 $\mu$ M	Biaffin GmbH & CO KG, Deutschland
Fura-2AM	8-12 $\mu$ M	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
goat anti-rabbit NCLX	1:200 in 5 %igem Milchpulver	Proteintech, Manchester, UK
IgG HRP conjugat donkey anti-rabbit	1:1000	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Kainat	100 $\mu$ M	abcam, UK
Längenmarker Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards		BIO-RAD, Hercules, CA, USA
MasterMix-Lösung (PCR)		5Prime, Hilden, Deutschland
Milchpulver	5 % in destilliertem Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normales Ziegen Serum (NGS)	2% bzw. 10% in 0,3 %igem Triton X-100-Lösung verdünnt	Gibco, Paisley, UK
OptiPrep-Lösung	6,2 % in L15 Medium Leibivitz ohne Glutamin	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen Sigma, Steinheim, Deutschland
Poly-D-Lysin- Hydrobromid (PDL)	5 mg/mL in destilliertem Wasser	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Primer	oIMR0113 oIMR0114 oIMR7338 oIMR7339	Biomers.net
pTet-ON7-Plasmid pTRE2-Plasmid		Clontech, Palo Alto, CA, USA
QuickStart™ Bradford 1x Dye Reagent		BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Tetrodotoxin	0,5 µM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Hydroxymethyl- Aminomethan- Hydrochlorid	40 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	0,25% bzw. 0,1%, in modifiziertem HBSS	Gibco, Paisley, UK
Verapamil	100 µM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 3:** Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung mit Herstellerangaben

Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	5 mg in 5 mL destilliertem Wasser aufgelöst die entstandene Stocklösung weiter mit PBS 1:500 verdünnt	Sigma-Aldrich, USA
Astrozyten-medium	Dulbeco modified Eagle's medium /Ham's F-12 Medium 1:1 ohne Glutamin 10 %iges fetales Rinderserum  oder 2 %iges Pferdeserum 1 %iges Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, UK  Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK
Extrazellulär-lösung (EZL)	11,6 mM HEPES  129,1 mM NaCl  5,9 mM KCl  11,5 mM Glucose  1,2 mM MgCl <sub>2</sub>  3,2 mM CaCl <sub>2</sub>  destilliertes Wasser pH 7,4 durch Titration mit 10 M NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland  Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hank's Balanced Salt Solution modifiziert 1x	Hank's Balanced Salt Solution 1x, ohne CaCl <sub>2</sub> , ohne MgCl <sub>2</sub> 1 %iges Penicillin/Streptomycin 1 M HEPES (pH = 7,25)	Gibco, Paisley, UK  Gibco, Paisley, UK Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lämmli-Puffer	6,2 mL Wasser 1,0 mL 1 M Tris-Lösung (mit pH 6,8)  3,2 mL Glycerol 3,2 mL 10 %iges SDS in PBS 0,8 mL β-Mercaptoethanol  1,6 mL Bromphenol-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland  SERVA, Deutschland Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland SERVA, Deutschland
Lysepuffer	Complete Mini Protease Inhibitor- Tablette 54,6 g Saccharose 2 mL 2 M Tris-HCl-Lösung 1 mL 0,5 M EDTA-Lösung 125 µL 1 M Dithiothritol-Lösung	Roche, Deutschland
Lysereagenz (Schwanz-biopsie)	25 mM Natriumhydroxidlösung  0,2 mM Ethylendiamintetraessigsäure	Riedel & de Haen, Seelze, Deutschland Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

Motoneuron-medium	Neurobasalmedium 2 %iges B27 0,2 %iges N2 1 mM L-Glutamin 2 %iges Pferdeserum 1 %iges Penicillin/Streptomycin 3 µL/Well 2ng/mL brain derived neurotrophic factor	Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK Gibco, Paisley, UK PreproTech, Hamburg, Deutschland
NSC34-Medium	DMEM F-12 mit L-Glutamin 10 %iges fetales, Tetrazyclin freies Kalbsserum 1 %iges Penicillin/Streptomycin 200 µg/mL Gentamycin  200 µg/mL Hygromycin B	Gibco, Paisley, UK Lonza, Basel, Schweiz  Gibco, Paisley, UK Geneticin®; Gibco, Paisley, UK Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PBS 10x	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in destilliertem Wasser	Carl, Roth, Deutschland Merck, Deutschland Merck, Deutschland Merck, Deutschland
PBS 1x	100 mL 10x PBS 900 mL destilliertes Wasser	
SDS-Laufpuffer 10x	30,24 g 250 mM Tris 142,5 g 1,9 M Glycin 10 g 1 %iges SDS 1000 mL destilliertes Wasser.	Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA SERVA, Deutschland
SDS-Laufpuffer 1x	900 mL Wasser 100 mL 10x SDS-Laufpuffer	
TBS 10x	24,2 g Tris 80 g NaCl 1000 mL destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich, USA Carl, Roth, Deutschland
TBS-T 1x	100 mL 10x TBS 1 mL Tween20 900 mL Wasser	Sigma-Aldrich, USA
Transferpuffer 10x	23,23 g Tris 112,6 g Glycin 1000 mL destilliertes Wasser	Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA
Transferpuffer 1x	100 mL 10x Transferpuffer 200 mL Methanol 700 mL Wasser	VWR Chemicals, Frankreich
Triton-X 0,3%	42 µL Triton-X in 3 %igem BSA in PBS	Sigma-Aldrich, USA

## 4.2 Tiere

Zur Generierung von primären MN-Kulturen wurden männliche Mäuse, die die hSOD1G93A-Mutation des humanen SOD1-Gens (B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J, JAX Mice, Bestandsnummer 004435, Jackson Labor, Bar Harbor, ME, USA) exprimierten (Gurney 1994), mit nicht-transgenen Weibchen verpaart (C57BL/6J,

Jackson Labor, Bar Harbor, ME, USA). Alle Mäuse wurden unter kontrollierten Bedingungen (Lufttemperatur 22 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55-60 %, Tag-Nacht-Zyklus 10:14, Lichtexposition ab 6.00 Uhr) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Alle durchgeführten Tierexperimente stehen im Einklang mit den deutschen Tierschutzgesetzen.

### **4.3 Primäre Motoneuron Co-Kulturen**

Die primären MN Co-Kulturen dienen der Visualisierung und Quantifizierung des NCLX durch immunhistochemische Analysen, der Untersuchung des Überlebens der MN durch das Überlebensassay und der Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration.

#### **4.3.1 Vorbereitungen für die Motoneuron Co-Kultur**

In Vorbereitung auf die Aussaat von Zellen wurden sterile Deckgläser mit 12 mm Durchmesser in 24-Wellplatten sortiert, mit 150 µL 5 mg/mL Poly-D-Lysin-Hydrobromid beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem, destilliertem Wasser wurden die Platten mit 500 µL Astrozytenmedium pro Vertiefung befüllt und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt bis zur Durchführung der Experimente gelagert.

#### **4.3.2 Präparation des Rückenmarks und Genotypisierung der Mausembryonen zur Gewinnung von Motoneuronen und Astrozyten**

Für die MN Co-Kultur wurden MN und Astrozyten aus dem spinalen Vorderhorn von E13 Mausembryonen gewonnen. Durch Dislokation der Halswirbelsäule wurden dazu die Muttertiere getötet, mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und in modifiziertem *Hank's Balanced Salt Solution 1x* (HBSS) wie folgt präpariert. Die Haut des Abdomens wurde in der Mittellinie horizontal inzidiert und der Einschnitt beidseits nach kaudal erweitert. Anschließend wurde der Uterus entnommen und samt Fruchtblase und Eihaut eröffnet. Nach Durchtrennung der Nabelschnur transferierte man die Embryonen auf eine 24-Wellplatte. Die Rückenhaut der Embryonen wurde schichtweise abgezogen bis das Rückenmark zum Vorschein kam. Vom extrahierten Rückenmark wurden die dorsalen Anteile mittels Skalpell entfernt, und das ventrale Seitenhorn für weitere Untersuchungen entnommen. Dieses wurde in fünf Stücke geteilt, in modifizierter

HBSS auf Eis gelegt und entsprechend dem Genotyp der nicht-transgenen oder der hSOD1G93A-Gruppe zugeordnet.

Zur Genotypisierung wurde eine DNA-Isolation mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierzu wurden Biopsien an den Schwänzen der Mausembryonen entnommen und in 75 µL des alkalischen Lysereagens für 30 min bei 95 °C inkubiert, anschließend für 5 min auf Eis gelegt und 40 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-Hydrochlorid hinzugegeben. Für die PCR wurde 1 µL der DNA-Probe mit 10 µL destilliertem Wasser, 10 µL MasterMix-Lösung und jeweils 1 µL Primer (Tabelle 4) vermischt. Es wurde das in der Tabelle 5 beschriebene Programm am T3 Thermocycler durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend auf ein 1,5 %iges Agarosegel übertragen.

**Tabelle 4:** Primer zur Genotypisierung der Mausembryonen mittels Polymerasekettenreaktion

Primer	Sequenz 5' → 3'	Primer-Typ	Größe
oIMR0113	CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA	hSOD1G93A	236 Basenpaare
oIMR0114	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA	hSOD1G93A	
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Kontrolle	324 Basenpaare
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Kontrolle	

**Tabelle 5:** Programm zur Genotypisierung von Mausembryonen mittels Polymerasekettenreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	95 °C	3 min	nach Schritt 4 Wiederholung der Schritte 2 — 4 für 35 Zyklen
2	95 °C	30 s	
3	60 °C	30 s	
4	72 °C	45 s	
5	72 °C	2 min	
6	4 °C	-	

Die Entnahme des Rückenmarks und die Genotypisierung führte Svetlana Tausch durch.

### 4.3.3 Isolation und Aussaat von Motoneuronen und Astrozyten

Die folgende Zellisolation folgt einem nach Haastert *et al.* modifiziertem Protokoll (Haastert et al. 2005). Zur Isolation von MN und Astrozyten aus dem ventralen Seitenhorn wurde das Gewebe nach dreimaligem Waschen mit modifiziertem HBSS mit 0,1 %igem Trypsin für 15 min in 37 °C warmem Wasserbad verdaut. Nach Entfernung der HBSS und Zugabe von 80 µL 2 mg/mL DNase I und 4 mL Motoneuronmedium wurde das Gewebe mithilfe von drei Glaspipetten mit abnehmendem Durchmesser homogenisiert. Zur Auftrennung der Zellen wurde 6,2 %ige OptiPrep-Lösung hinzugefügt und für 15 min bei 500 x g gekühlt zentrifugiert. Das dadurch entstandene Pellet enthielt die Astrozytenfraktion, während sich die MN in der Interphase zwischen OptiPrep-Lösung und Medium wiederfanden.

Die MN-Fraktion wurde abpipettiert, mit Motoneuronmedium versetzt und bei 500 x g für 3 min gekühlt zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet erneut in 1 mL Motoneuronmedium aufgelöst. Mit der Neubauer-Zählkammer ließ sich die Anzahl der MN ermitteln, um die Aussaat mit einer Zelldichte von 15.000 Zellen/Well (für immunhistochemische Analysen und das Überlebensassay) bzw. 30.000 Zellen/Well (für intrazelluläre Calciummessungen) auf die zuvor generierte Astrozyten-Monoschicht zu gewährleisten.

Das Astrozyten-Pellet wurde in 1 mL Astrozytenmedium aufgelöst, die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt und mit einer Zelldichte von 50.000 Zellen/Well auf Poly-D-Lysin Hydrobromid beschichteten Deckgläsern in 24-Wellplatten ausgesät.

Das Medium aller Kulturen wurde zwei Mal pro Woche gewechselt. Das Astrozytenmedium enthielt in der ersten Woche *in vitro* fetales Rinderserum, ab der zweiten Woche wurde dieses durch Pferdeserum ersetzt. Bildeten die Astrozyten eine monozytäre Schicht, so wurden die Zellen mit 5 µL 500 µM Arabinofuranosyl-Cytidin-Säure in 500 µL Astrozytenmedium für 24 h inkubiert, um die Zellteilung zu hemmen. Vor der Aussaat von MN auf die Astrozytenschicht wurde das Astrozytenmedium mit Motoneuronmedium ausgetauscht. Alle Platten wurden im Inkubator mit einer Temperatur von 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

#### 4.4 NSC34-Kultivierung

Die NSC34-Zellen wurden für die semiquantitative Bestimmung der Proteinexpression des NCLX-Transporters mittels Western Blot-Verfahren genutzt. Bei den NSC34-Zellen handelt es sich um eine murine Hybridlinie aus Neuroblastoma-Zellen und embryonalen Vorderhornzellen. Sie zeichnen sich durch MN-spezifische Eigenschaften aus, wie die Synthese und Sekretion von Acetylcholin, die Expression von Neurofilament-Tripletproteinen sowie der Fähigkeit zur Generierung von Aktionspotentialen (Cashman et al. 1992). Die NSC34-Zellen wurden vom Institut für Biologie an der Universität „*Tor Vergata*“ in Rom, Italien von Prof. Maria T. Carri zur Verfügung gestellt. Die Zellen sind stabil mit einem pTet-ON7- sowie pTRE2-Plasmid transfiziert. Das pTet-ON7-Plasmid codiert einen reversen, Tetrazyklin-regulierten Transaktivator mit geringem, basalem Expressionslevel, das durch die Applikation von Doxycyclin zur Überexpression induziert werden kann. Das pTRE2-Plasmid codiert entweder den humanen SOD1-Wildtyp (hSOD1WT-NSC34) als Kontrolle oder die humane SOD1G93A-Mutation (hSOD1G93A-NSC34) (Ferri et al. 2006). Die Zelllinie ist ein geeignetes Modell zur Erforschung ALS-assoziiierter Mutationen und erlaubt die quantitative Bestimmung der Proteinexpression. Die Ergebnisse können durch die Reinheit der Zellkultur auf die MN-ähnlichen Zellen zurückgeführt werden und die Proteinexpression durch Astrozyten entfällt.

Zur Kultivierung wurden die gefrorenen Zellen bei Raumtemperatur (RT) vorsichtig aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min, eine Resuspension des Zellpellets mit NSC34-Medium und die Aussaat in 5 mL Kulturflaschen mit 5 mL NSC34-Medium. Ein Medienwechsel erfolgte bei einem Farbumschlag vom Rötlichen ins Gelbliche, was ein Indikator für den Nährstoffverbrauch darstellte. Bei konfluentem Wachstum wurde das Medium entfernt und die Zellen durch 0,25 %iges Trypsin nach 3-minütiger Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Neues Medium wurde hinzugesetzt und zu gleichen Teilen in neue Kulturflaschen überführt. 48 h vor Versuchsbeginn wurde dem Medium 2 µg/mL Doxycyclin hinzugefügt, um die Proteinexpression zu induzieren.

Die Kulturen verlieren nach der sechsten Passage die Expressionsfähigkeit der transfizierten Vektoren. Aus diesem Grund erfolgten die Western Blot-Versuche an NSC34-Kulturen innerhalb der ersten bis dritten Passage. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.



## 4.5 Western Blot-Verfahren zur Untersuchung des NCLX-Expressionslevels in NSC34-Kulturen

Die Bestimmung der hSOD1 induzierten Veränderungen der Proteinexpression des NCLX-Transporters erfolgte mittels Western Blot. Die Quantifizierung der NCLX-Expression erfolgte dabei unter unbehandelten Bedingungen, nach Forskolin-Behandlung zur Induktion der NCLX-Aktivität oder nach CGP37157-Inkubation zur Inhibition der NCLX-Aktivität. In diesem Zusammenhang wurden die NCLX-Expressionslevel in hSOD1G93A- und Wildtyp-Neuronen nach Forskolin- oder CGP37157-abhängiger NCLX-Modulation untersucht.

### 4.5.1 Behandlung der NSC34-Zellen mit Forskolin und CGP35157

Die Doxycyclin induzierten NSC34-Kulturen wurden für 24 h mit 500  $\mu$ L *DMEM/F-12 mit L-Glutamin* (als Kontrolle), 5  $\mu$ M CGP35157 oder 100  $\mu$ M Forskolin inkubiert. Beide Substanzen waren in *DMEM/F-12 mit L-Glutamin* gelöst. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Zugabe von Trypsin zu vermeiden, wurden die Zellen mithilfe eines Schabers vom Flaschenboden gelöst, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Lagerung der Zellpellets bei -20 °C bis zur Durchführung der Western Blot-Experimente.

### 4.5.2 Proteinisolation aus den behandelten und nicht behandelten NSC34-Zellen

Zur Proteinisolation wurde jedes Zellpellet in Lysepuffer aufgelöst und mithilfe von Kanülen mit 0,4 mm Durchmesser durch wiederholtes Aufziehen homogenisiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellysate bei 1000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße übertragen.

Für die photometrische Messung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm wurden 2  $\mu$ L des Überstandes mit 498  $\mu$ L destilliertem Wasser und 500  $\mu$ L des *QuickStart™ Bradford 1x Dye Reagent* vermischt und unter Lichtabschirmung bei RT für 10 min inkubiert. Eine Küvette mit 500  $\mu$ L destilliertem Wasser und 500  $\mu$ L der *Bradford*-Lösung diente der Kalibrierung. Bei einer Proteinkonzentration oberhalb der Messgrenze, wurde die Probe mit Lysepuffer weiter verdünnt und die photometrische

Messung wiederholt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Überstände mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 4:1 verdünnt, für 5 min bei 100 °C gekocht und bei -20 °C gelagert.

#### 4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit NCLX-Antikörper

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde zunächst ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel mit 0,75 mm Dicke hergestellt. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels kann aus Tabelle 6 entnommen werden.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des 10 %igen Polyacrylamid-Gels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

	Zusammensetzung	Menge
Trenngel	Wasser	9900 µL
	30% Acrylamid	8300 µL
	1,5 M Tris (pH 8,8)	6300 µL
	10% SDS	250 µL
	10% Ammoniumpersulfat	250 µL
	Tetraethylmethyldiamin	10 µL
Sammelgel	Wasser	2700 µL
	30% Acrylamide	670 µL
	1,0 M Tris (pH 6,8)	500 µL
	10% SDS	40 µL
	10% Ammoniumpersulfat	40 µL
	Tetraethylmethyldiamin	4 µL

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Natriumdodecylsulfat-Laufpuffer (SDS) befüllt und mit den Gel-Kassetten bestückt. Die erste Tasche wurde mit 5 µL des Längenmarkers *Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards* befüllt, die nachfolgenden mit dem entsprechenden Volumen der Protein-Lösungen, sodass jede Proteintasche die gleiche Proteinmenge enthielt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und wurde beendet, wenn der Längenmarker das Gelende erreichte.

Zur Übertragung der Proteinbanden vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die Elektrophoresekammer mit Eis gekühltem Transferpuffer befüllt und den folgenden Komponenten in der angegebenen Reihenfolge (vom Minus- zum Pluspol) beladen:

- 1.) zwei in Transferpuffer getränkte Schwämme
- 2.) ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier

- 3.) das Polyacrylamid-Gel
- 4.) die Nitrocellulose-Membran, welches 1 min in Methanol inkubierte und erst mit Wasser, dann mit Transferpuffer gewaschen wurde
- 5.) ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier
- 6.) ein in Transferpuffer getränkter Schwamm

Das Blotten erfolgte mit 100 V für 60 min. Die Nitrocellulose-Membran wurde im Anschluss mit 5 %igem Milchpulver (in 1x TBS-T) für eine Stunde bei RT und anschließend mit 5 %igem Albumin aus Rinderserum (BSA; in 1x TBS-T) für 1,5 h bei RT geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren.

Die Membran wurde mit den Antikörpern goat anti-rabbit NCLX (1:200 in 5 %igem Milchpulver), anti- $\beta$ -Actin (1:630 in 5 %igem Milchpulver) und 0,4  $\mu$ L des *Control Precision Strep Tracking HRP* über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T für 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper *IgG HRP conjugat donkey anti-rabbit* für eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T für jeweils 15 min wurde jede Membran mindestens 4 min mit *Clarify Western ECL Blotting Substrate Kit* bei RT umspült. Die Bildentwicklung über das Prinzip der Chemilumineszenz erfolgte mit der LAS3000-Kamera und der Software *Image Reader LAS3000IR* (Version 2.2). Die Expositionszeit betrug 2 min.

#### 4.5.4 Quantifizierung der NCLX-Proteinexpression mittels ImageJ

Die Messung der relativen Dichte der NCLX-Banden als Intensität erfolgte mit *ImageJ* (Version 1.48v, National Institute of Health, USA). Die Intensität der NCLX-Bande wurde zur Intensität der  $\beta$ -Actin-Bande normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von drei unterschiedlichen Kulturansätzen. Die relative Dichte des NCLX wurde innerhalb jeder Behandlungsgruppe zwischen hSOD1WT-NSC34 und hSOD1G93A-NSC34 sowie innerhalb eines Genotyps zwischen der Kontrolle und den zwei Behandlungen verglichen.

#### 4.6 Quantifizierung der Expressionslevel des NCLX-Transporters über immunhistochemische Analyse in Motoneuron Ko-Kulturen

Neben dem Proteinlevel an den NSC34-Zellen im Western Blot wurde anschließend spezifisch das basale Proteinlevel in MN mittels Immunhistochemie bestimmt. Dafür

wurden Antikörper gegen den NCLX sowie gegen MN-spezifische Neurofilamente eingesetzt. Damit wurde untersucht, ob hSOD1G93A induzierte Veränderungen der NCLX-Expression auch in primären MN detektierbar sind.

#### 4.6.1 Immunhistochemische Färbung mit dem NCLX-Antikörper

Nach 13-15 Tagen *in vitro* wurden die MN mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und zwei Mal mit Phosphat gepufferter Salzsäure (1x PBS) gewaschen. Zur verbesserten Antikörper-Bindung erfolgte eine Inkubation mit 1 %igem SDS für 10 min bei RT und anschließendes, zweimaliges Waschen mit 1x PBS. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches eine permeabilisierende und denaturierende Wirkung besitzt. Schwer zugängliche Proteine oder maskierte Epitope können dadurch freigelegt werden (Brown et al. 1996). Zur Verminderung unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurden die Zellen mit 10 %igem normalem Ziegen Serum (NGS) für 2 h bei RT geblockt.

Die Inkubation mit goat anti-rabbit NCLX in 2 %igem NGS als primären Antikörper mit einem Verdünnungsgrad von 1:1000 erfolgte über 48 h bei 4 °C. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa 488 verwendet, das mit 10 %igem NGS auf 1:200 verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT. Nach erneutem Blocken mit 10 %igem NGS über 2 h bei RT wurde analog eine zweite Färbung mit anti-Neurofilament H *non-phosphorylated* (SMI32R) in der Verdünnung 1:1000 vorgenommen, um MN zu identifizieren (Carriedo et al. 1996). Alexa 594 in der Verdünnung 1:200 diente als sekundärer Antikörper.

Zur Darstellung des Zellkerns wurden die Deckgläser für 5 min bei RT mit 2 µg/mL 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) behandelt. Nach jeder Antikörper- bzw. Farbstoffinkubation wurden die Zellen zweimalig mit 1x PBS für jeweils 5 min und 10 min gewaschen. Abschließend folgten die Fixierung der Deckgläser auf Objektträgern mit Fluoromount-G und eine lichtgeschützte Lagerung bei 4°C.

#### 4.6.2 Messung der Fluoreszenzintensität des NCLX-Signals mittels Konfokalmikroskopie und ImageJ

Die Analyse der NCLX-Proteinexpression erfolgte durch die Aufnahme von axialen Bildstapeln (z-Stacks) am Konfokalmikroskop *Laser Scanner Microscope 510* mit einem 64x Ölimmersionsobjektiv und der Software ZEN 2008 (Zeiss, Jena,

Deutschland). Für jede untersuchte Zelle wurden z-Stacks im roten (anti-SMI32R), grünen (anti-NCLX) und blauen Kanal (DAPI) aufgenommen, die jeweils mit konstanter Einstellung (Auflösung 512 x 512, 12 bit, speed: 8, average: 4, z-Stack-Intervall: 0,7 µm) erfolgten.

Die weitere Prozessierung der Daten wurde mithilfe des Programms *ImageJ* (Version 1.48v, National Institute of Health, USA) durchgeführt, womit zunächst die z-Stacks der drei Kanäle voneinander getrennt und die einzelnen Schichten über die Funktion *maximum projection* summiert wurden. Die Summation des roten Kanals diente zur Markierung der Zellgrenzen, die als „*region of interests*“ (ROI) auf das summierte Bild des grünen Channels übertragen wurde. Eine Region außerhalb der Zelle wurde zur Ermittlung des Hintergrund-Signals markiert. Für beide Regionen wurde die Fläche, die relative Intensität sowie die Durchschnittsintensität berechnet, sodass über die nachfolgende Formel die korrigierte Fluoreszenz der gesamten Zelle (CTCF, corrected total cell fluorescence) kalkuliert werden konnte (Burgess et al. 2010):

$$\text{CTCF} = \text{relative Intensität}_{\text{ROI}} - (\text{Fläche}_{\text{ROI}} \times \text{Durchschnittsintensität}_{\text{Hintergrund}})$$

Die CTCF des NCLX-Signals wurde zur CTCF des SMI32R-Signals normalisiert (relative CTCF). Zur statistischen Auswertung wurde die relative CTCF von mindestens fünf Zellen pro Deckglas für jede Gruppe von jeweils neun Deckgläsern aus drei verschiedenen Kulturansätzen herangezogen und zwischen nicht-transgener und hSOD1G93A-Gruppe verglichen.

#### **4.7 Überlebensassay zur Untersuchung des Zellüberlebens nach Kainat-induzierter Exzitotoxizität mit und ohne Forskolin/CGP35157 in Motoneuron Ko-Kulturen**

Kainat ist ein Ligand des AMPA-R und fungierte im folgenden Überlebensassay als exzitotoxischer Stimulus, welcher zum neuronalen Zelluntergang führt (Wang et al. 2005). Eine kombinierte Inkubation von NCLX-Modulatoren mit Kainat sollte Aufschluss darüber geben, ob Forskolin oder CGP35157 das Potenzial haben, die Kainat-induzierte Exzitotoxizität zu vermindern. Weiterhin wurde durch die alleinige Applikation der NCLX-Modulatoren die Effekte auf das neuronale Überleben unter nativen Bedingungen untersucht.

#### **4.7.1 Behandlung der Motoneuron Co-Kulturen mit Kainat, Forskolin und CGP35157**

Am 13.-15. Tag *in vitro* erfolgte eine Inkubation mit 100  $\mu$ M Kainat, 5  $\mu$ M CGP37157, 100 $\mu$ M Forskolin, 100  $\mu$ M Kainat in Kombination mit 5  $\mu$ M CGP35157 oder 100  $\mu$ M Kainat in Kombination mit 100  $\mu$ M Forskolin. Den Kontrollen (nativ) wurde 0,01 %iges Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Kainat wurde zuvor in destilliertem Wasser gelöst, Forskolin und CGP35157 in DMSO.

Nach 12-stündiger Exposition im Inkubator wurden die Zellen, analog dem Vorgehen im Kapitel 4.6.1, mit 4 %igem PFA für 20 min bei RT fixiert, zweimalig mit PBS gewaschen und immunhistochemisch angefärbt.

#### **4.7.2 Immunhistochemische Färbung mit anti- $\beta$ III-Tubulin und anti-SMI32R**

Die fixierten Zellen wurden mit 10 %igem NGS für 2 h bei RT geblockt. Zur Identifikation der gesamten neuronalen Population erfolgte erst eine Inkubation mit dem primären Antikörper anti- $\beta$ III-Tubulin (1:250, (Lee et al. 1990)), und dem sekundären Antikörper Alexa 488 (1:200). Im Anschluss wurde erneut mit 10 %igem NGS geblockt und die MN-spezifische Färbung mit anti-SMI32R (1:1000) (Carriedo et al. 1996) und Alexa 594 (1:200) als sekundären Antikörper durchgeführt. Die Inkubationszeit aller Antikörper für beide Färbungen betrug eine Stunde bei RT. Primäre Antikörper wurden in 2 %iger NGS-Lösung verdünnt, sekundäre in 10 %iger NGS-Lösung. Abschließend wurden die Zellen mit DAPI für 5 min bei RT behandelt. Nach jedem Inkubationsschritt mit einem Antikörper oder DAPI wurden die Zellen mit 1x PBS für jeweils 10 min und 5 min gewaschen. Es folgte die Fixierung der Deckgläser auf Objektträgern mit Fluoromount-G und eine lichtgeschützt Lagerung bei 4 °C.

#### **4.7.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zellüberlebens nach Inkubation mit Kainat, Forskolin oder CGP35157**

Unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 20x Objektiv erfolgte die manuelle Auszählung aller Neurone (N) im grünen Kanal und die der MN im roten Kanal. Die Quantifizierung der sogenannten Nicht-Motoneurone (nMN) ergab sich aus der Gesamtneuronenzahl, wovon die MN-Anzahl subtrahiert wurde:

$$N_{nMN} = N_N - N_{MN}$$

Für die Berechnung der prozentualen Anteile von MN und nMN diente die Anzahl der N als Grundwert und die Anzahl der MN bzw. nMN als Prozentwert. Die Auszählungen erfolgten in drei Ansätzen für jede Behandlung (nativ, Kainat, Forskolin, CGP35157, Kainat + CGP35157, Kainat + Forskolin), pro Kulturansatz. Die Daten aus insgesamt drei unterschiedlichen Kulturansätzen wurden statistisch ausgewertet. Ein Vergleich erfolgte zwischen der nicht-transgenen und hSOD1G93A-Gruppe und zwischen den fünf Behandlungen anhand der absoluten Zellzahlen sowie der prozentualen Anteile der MN bzw. nMN an der neuronalen Gesamtpopulation.

#### **4.8 Intrazelluläre Calciummessungen nach Forskolin-Exposition in Motoneuron Co-Kulturen**

Unter Verwendung der primären MN Co-Kulturen sollte die Auswirkung von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration mit Hilfe der Methode des *Calcium imagings* funktionell untersucht werden. Ziel war es, Unterschiede in der Forskolin-abhängigen Calciumfreisetzung aus Mitochondrien in hSOD1G93A-MN gegenüber nicht-transgener Zellen nachzuweisen.

##### **4.8.1 Prinzip der intrazellulären Calcium-Konzentrationsbestimmung**

Als ratiometrischer Calcium-Indikator wurde Fura2-AM (Acetoxymethylester-Form des Fura2) verwendet, da die Ergebnisse im Vergleich zu Einzelwellenindikatoren nicht von ungleichmäßiger Indikator-Verteilung innerhalb der Zelle, Photobleaching oder der Zelldicke beeinflusst werden.

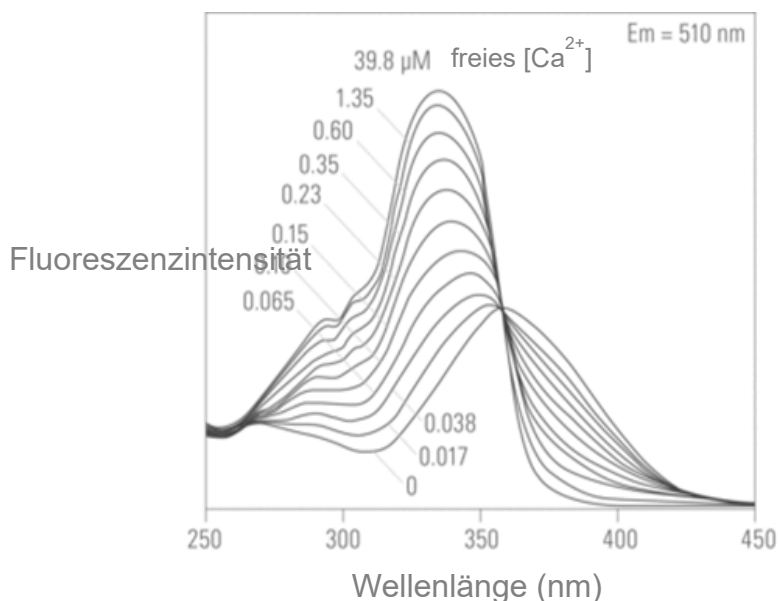
Fura2-AM liegt zunächst in seiner Ester-Form vor und kann so durch die Zellmembran diffundieren. Über die Abspaltung der Estergruppe im Zytosol verliert es seine Membranpermeabilität, verbleibt in der Zelle und bindet dort hochaffin freie Calcium-Ionen. Nach Exzitation emittiert Fura2-AM Licht mit einer Wellenlänge von etwa 510 nm, wobei die Emissionsintensität von der Wellenlänge der Exzitation und der Calciumkonzentration abhängt. Im ungebundenen Zustand kann die maximale Emissionsintensität bei einer Exzitation mit 380 nm erreicht werden. Die maximale Emissionsintensität der gebundenen Form hingegen liegt bei einer Exzitation mit 350 nm. Misst man die Emissionsintensitäten bei beiden Exzitationen, kann ein

350 nm/380 nm-Quotient gebildet werden (R), der im direkten Zusammenhang mit der intrazellulären Calciumkonzentration steht. Ist die Calciumkonzentration gering, so wird R kleiner. Liegt eine hohe Calciumkonzentration vor, so wird R größer. Die Abbildung 3 stellt in diesem Zusammenhang die Emissionsintensitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen dar.

Die Änderung der zytosolischen Calciumkonzentration ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) kann bei bekanntem R über folgende Formel kalkuliert werden (Grynkiewicz et al. 1985).

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}] = K_D \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

mit  $K_D = 245$ ;  $\beta = 3,6$ ;  $R_{\min} = 0,08$ , gemessen bei Extrazellulärlösung ohne  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure (EGTA) und 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin;  $R_{\max} = 0,8$ , gemessen bei Extrazellulärlösung mit 30 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin (Carriedo et al. 2000).



**Abbildung 3:** Spektren der Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und unterschiedlicher Exzitation. (Emission,  $E_m$ ) (<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/widefield-calcium-imaging-with-calcium-indicator-fura2/>)

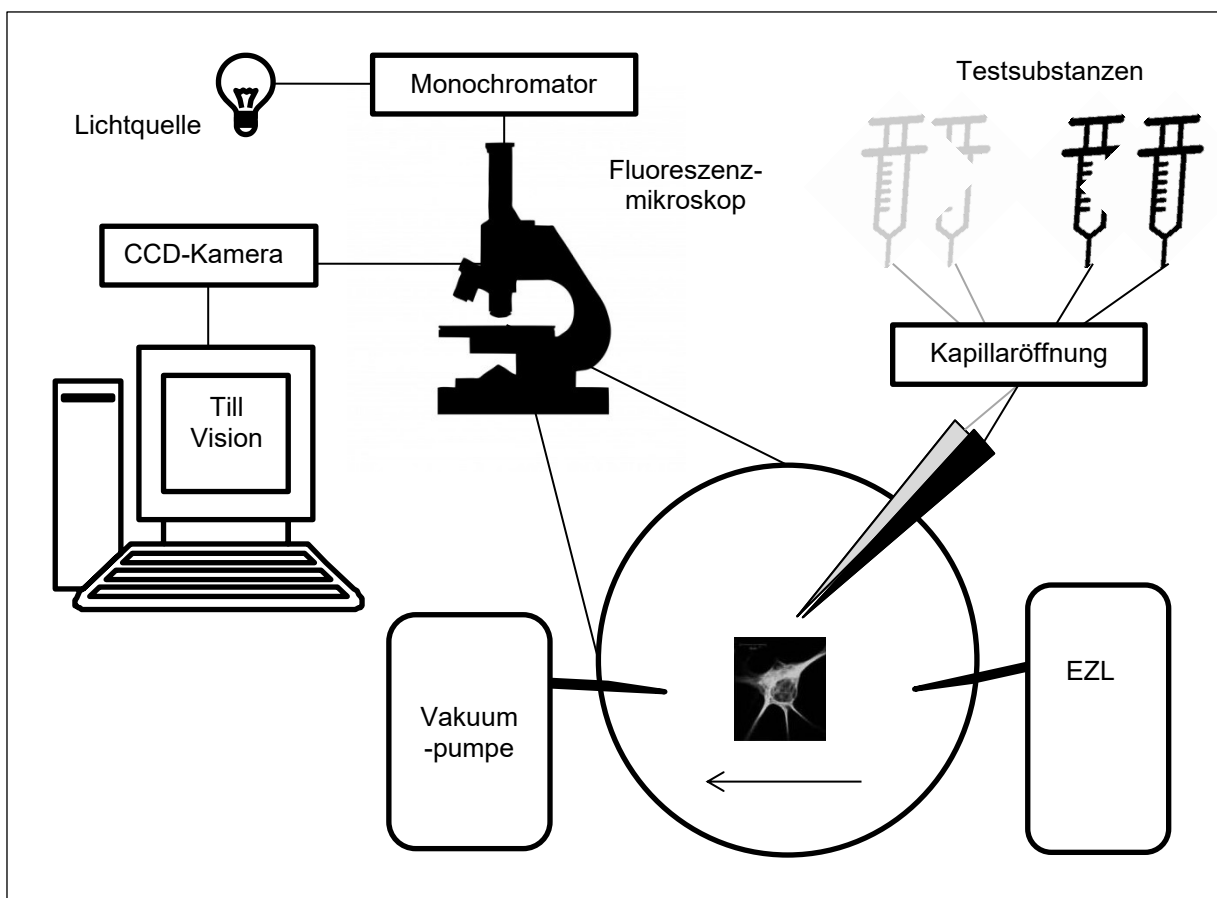
#### 4.8.2 Experimenteller Aufbau und allgemeiner Ablauf der Calciummessungen

Zum experimentellen Aufbau des *Calcium imaging*-Experiments (Abbildung 4) gehört ein Fluoreszenzmikroskop mit 40x Wasserimmersionsobjektiv, welches mit einem Monochromator, womit ein Lichtstrahl mit definierter Wellenlänge erzeugt werden kann, und einer CCD-Kamera (12 bit, Bining: 2x2) zur Aufnahme von



Fluoreszenzsignalen verbunden. Die Kalkulation der gemessenen Fluoreszenzsignale in R bzw. in  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  erfolgte durch das *TillVision Imaging*-Programm (Version 4.0, TillPhotonics, Gräfelfing, Deutschland).

Auf dem Objektisch des Mikroskops befindet sich die Messkammer, die über Zustrom- und Abflussvorrichtungen verfügt. Ein kontinuierlicher, pulsationsfreier Zufluss einer auf 39 °C erwärmten Extrazellulärlösung (EZL) wird durch die Reglo Z-Pumpe realisiert (Flussgeschwindigkeit: 7). Die EZL erhält die Zellen während der Messungen am Leben. Alle zugeführten Flüssigkeiten fließen über eine kontinuierlich laufende, Vakuum gesteuerte Absaugkanüle (-150 mbar) ab.



**Abbildung 4:** Aufbau des Calcium imaging-Experimentes.

Über eine Lichtquelle, einem Monochromator und einem Fluoreszenzmikroskop wird Fura2 als Calcium-Indikator mit einer Wellenlänge von 350 und 380 nm angeregt, welches zuvor mit den Zellen inkubiert wurde. Das emittierte Signal wird über eine CCD-Kamera gemessen und anhand des 380 nm/350 nm-Quotienten als Änderungen der Calciumkonzentration kalkuliert. Der Objektträger wird dabei ständig von einer Extrazellulärlösung (EZL) umspült. Über eine Vakuumpumpe fließen zugeführte Flüssigkeiten wieder ab, sodass ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom entsteht (Pfeil). Testsubstanzen aus unterschiedlichen Reservoirs können über zwei Polyimid-Spitzen appliziert werden. Die Öffnung der einzelnen Kapillaren kann manuell gesteuert werden. Eine Öffnung der Applikationsspitzen wird über ein Computer-gestütztes System realisiert.

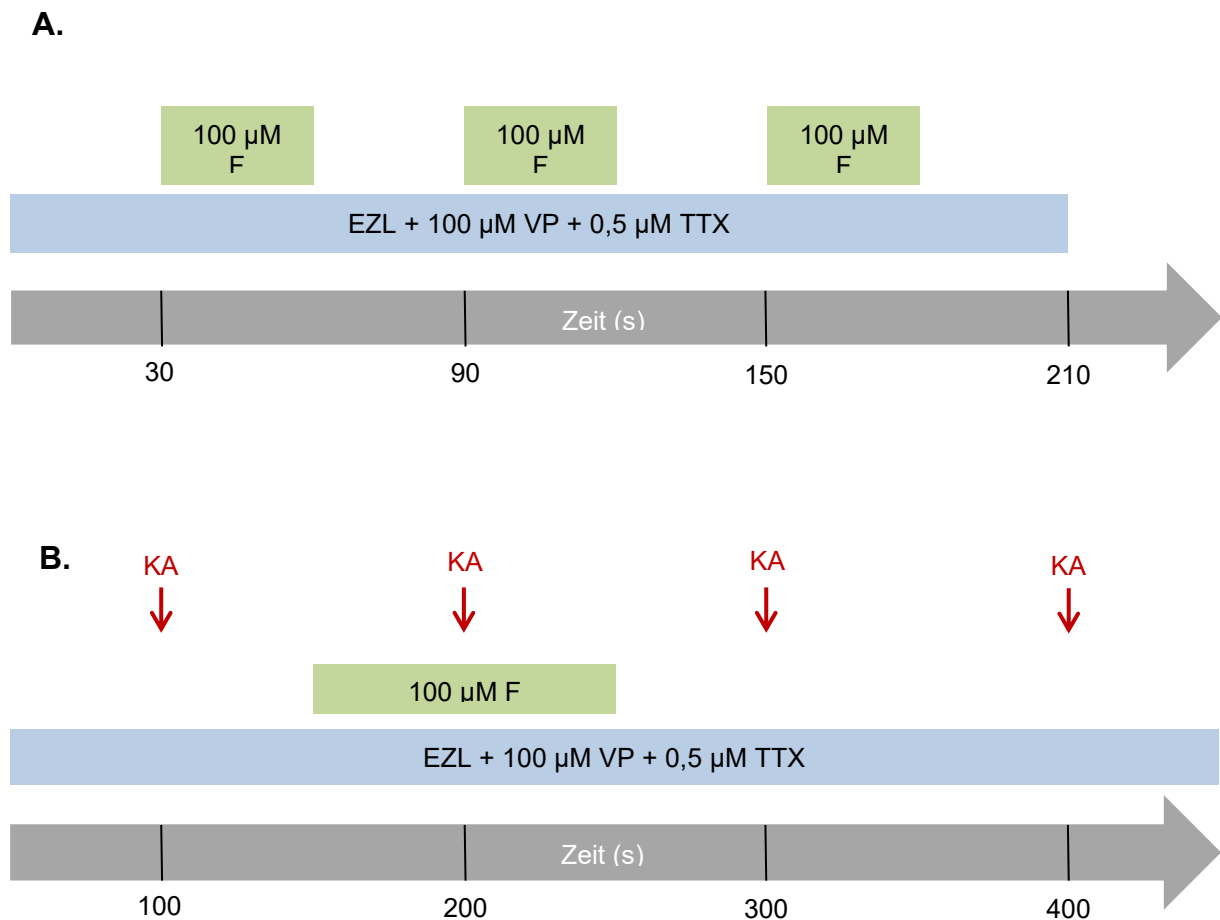
Ein spezielles Perfusionssystem erlaubt eine zeitlich präzise, Computer-gestützte Applikation von Testlösungen über zwei miteinander verbundenen Applikator-Spitzen aus Polyimid mit einem Innendurchmesser von 0,635 mm, die sich zwischen Zustrom und Abfluss und in einem Winkel von 30° zum Objektträger befinden. In jeder Spitze enden vier Kapillaren, die sich aus unterschiedlichen Reservoirs speisen. Die Öffnung der Kapillaren kann manuell gesteuert werden. Durch ein ebenso manuell steuerbares Luftdrucksystem wird ein konstanter Perfusionsdruck im Applikationssystem gewährleistet. Über die Applikator-Spitze 1 erfolgte die Zuleitung einer sog. Hintergrundlösung, über die Applikator-Spitze 2 eine Vordergrundlösung. Beide Lösungen enthielten neben der bestimmten Testsubstanz 200 µM Verapamil und 0,5 µM Tetrodotoxin in EZL, um spontane Zellaktivitäten zu blockieren (Grosskreutz et al. 2007).

Für eine Messung wurden 13-16 Tage alte MN-Kulturen mit dem Farbstoff Fura2-AM (8-12 µM) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Bei RT und unter Lichtabschirmung folgte eine 30-minütige Phase zur Abspaltung der Estergruppen des Fura2-AM. Anhand des Fluoreszenzmusters und der Morphologie wurden Neurone unter dem Mikroskop identifiziert und ihre Somata markiert („*region of interest*“, ROI), wobei der Zellkern ausgespart wurde. Anhand der Ausmessung des Zelldurchmessers erfolgte eine Zuordnung der Zelle zur MN-Gruppe bei einem Durchmesser > 30 µm oder zur nMN-Gruppe bei < 20 µm (Lautenschlager et al. 2013). Außerhalb einer Zelle wurde ein ROI 0 als Hintergrundsignal markiert. Die Expositionszeit der Exzitation betrug 5 ms und die Aufnahme Frequenz 5 Hz mit einer maximalen Anzahl von 4000 Zyklen.

Jedes Experiment wurde anhand von mindestens drei Deckgläsern pro Gruppe und pro Kulturansatz ausgewertet. Insgesamt gingen Messwerte aus drei unterschiedlichen Kulturansätzen in die statistische Auswertung ein.

#### **4.8.3 Applikationsprotokolle zur intrazellulären Calciummessung**

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, deren Protokolle in Abbildung 5 dargestellt sind. Die Versuchsreihe A zielte darauf aus, den akuten Effekt einer Forskolin-Applikation auf die  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  unter ruhenden Bedingungen zu untersuchen.



**Abbildung 5:** Applikationsprotokolle der Calcium imaging-Messungen in Motoneuron Ko-Kulturen.

Bei der Versuchsreihe **A.** wurde Forskolin allein und bei der Versuchsreihe **B.** Kainat unter Ab- oder Anwesenheit von Forskolin appliziert (Forskolin, F; Kainat, KA; Extrazellulärlösung, EZL; Verapamil, VP; Tetrodotoxin, TTX).

Dafür wurde in 30 s Intervallen abwechselnd die Hintergrund- oder Vordergrundlösung appliziert, wobei nur die Vordergrundlösung zusätzlich 100  $\mu$ M Forskolin enthielt. Nach dreimaliger Forskolin-Applikation wurden die Zellen abschließend für weitere 30 s der Hintergrund-Lösung ausgesetzt. Bei der Versuchsreihe B wurde Kainat genutzt, um das Ausmaß einer NCLX-Aktivierung mittels Forskolin auf die  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  während einer Zellaktivierung zu bestimmen. Dafür enthielt die Vordergrundlösung 100  $\mu$ M KA, die vier Mal in einem Abstand von 100 s für jeweils 2 s appliziert wurde. Kontinuierlich erfolgte die Zuleitung der Hintergrundlösung, wobei 50 s vor bis 50 s nach der zweiten Kainat-Stimulation auf eine 100  $\mu$ M Forskolin enthaltende Hintergrundlösung umgestellt wurde.

#### 4.8.4 Datenprozessierung der erhobenen Calciummessungen

Die  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  jedes ROI wurde durch das Programm *TillVision Imaging* anhand der oben genannten Formel aus dem Quotienten der gemessenen Emissionsintensität bei Exzitation mit 380 nm und 350 nm in einem zeitlichen Abstand von 0,2 s berechnet. Unter Verwendung von Microsoft Excel® 2007 erfolgte die Normalisierung des  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  auf den  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  von ROI 0 (Hintergrund). Für jede Messkurve wurde zudem der Anfangszeitpunkt der ersten Stimulation (mit Forskolin beim Applikationsprotokoll A und Kainat beim Applikationsprotokoll B) auf  $t = 100$  s und die Anfangswerte 5 s vor der ersten Stimulation auf  $\Delta[\text{Ca}^{2+}] = 0$  korrigiert. Die Baseline vor jeder Stimulation ist ein Mittelwert aus allen  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ -Werten 5 s vor dem Stimulationszeitpunkt. Alle Messungen, bei denen die Zellen eine Reaktion auf die Stimulation zeigten, wurden in die Auswertung einbezogen. Eine Messkurve wurde als Reaktion gewertet, wenn die Erhöhung der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  unter Stimulation mindestens das 2-fache der Ausgangskonzentration ohne Stimulation erreichte.

Zur Quantifizierung der Messkurven wurden drei Parameter herangezogen:

- 1.) Das Integral „*area under the curve*“ (AUC) während einer Stimulation berechnete sich mithilfe der Trapez-Formel. Für das Applikationsprotokoll A stellt die AUC das Integral über die gesamte Dauer der Forskolin-Applikation (30 s) dar, für das Protokoll B vom Zeitpunkt der Kainat-Applikation bis 50 s danach.
- 2.) Als maximaler Wert  $P_{\max}$  ist der Abstand zwischen der Baseline und dem größten Wert im Zeitraum 10 s vor bis 50 s nach einer Stimulation definiert.
- 3.) Als Zeitkonstante T ist die Dauer zwischen  $P_{\max}$  (100 %) und dem Zeitpunkt, bei dem  $P_{\max}$  sich auf 50 % reduzierte, angegeben. Die Kalkulation dieser Parameter wurde mit Microsoft Excel 2007 und MatLab R2010a durchgeführt.

#### 4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms *SigmaPlot* Version 13.0. Die im Kapitel 5 angegebenen Werte aus Immunhistochemie, Western Blot, Überlebensassay und *Calcium imaging* stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar. Für die Messreihe Forskolin + Kainat (Protokoll B) beim *Calcium imaging* ist der Standardfehler angegeben. Über die Anwendung des Shapiro Wilk-Tests wurde

überprüft, ob eine Normalverteilung der Werte vorlag. Zur Feststellung eines signifikanten Unterschieds wurde bei normalverteilten Werten der T-Test für Vergleiche zwischen zwei Gruppen oder der One Way ANOVA-Test bei einem Vergleich zwischen mehreren Gruppen als parametrische Tests durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Werten kam der Mann-Whitney Rank Sum-Test für einen Vergleich zwischen zwei Gruppen oder der Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks-Test für einen Vergleich zwischen mehreren Gruppen als nicht-parametrische Tests zum Einsatz. Bei einem zweidimensionalen Vergleich wurde der Two Way ANOVA-Test verwendet. Das Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

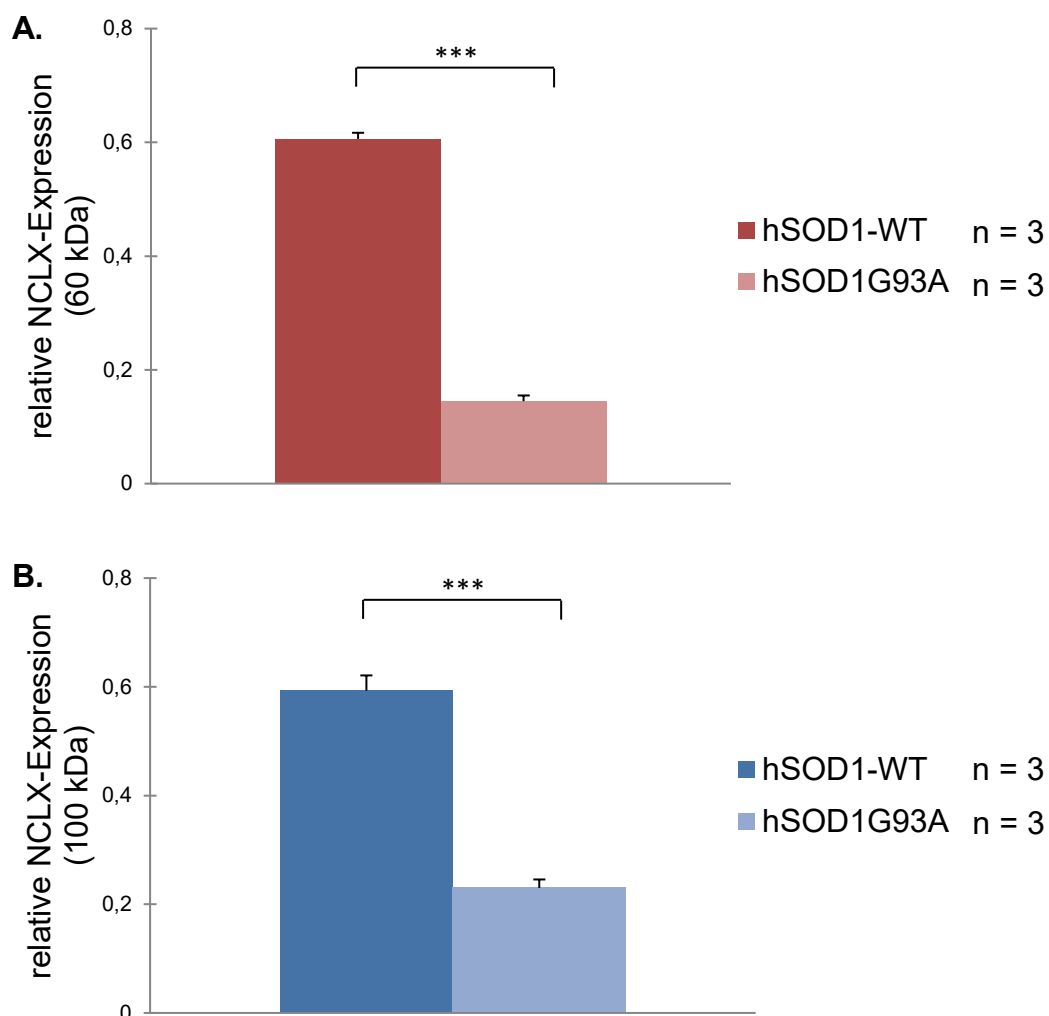
### 5.1 NCLX-Expression in der Pathogenese der ALS

Zur Charakterisierung der ALS-bedingten Veränderungen wurde die Expression des NCLX Transporters untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten mit Hilfe der Western Blot-Methode unter Verwendung von NSC34-Zellen. Diese überexprimierten entweder das humane SOD1-Gen als hSOD1WT oder die hSOD1G93A-Mutation. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt und ein Durchschnittswert der relativen NCLX-Expression gebildet. Im Western Blot wurden zwei für den NCLX-Transporter spezifische Banden quantitativ bei etwa 60 kDa (NCLX<sub>60 kDa</sub>) und bei ca. 100 kDa (NCLX<sub>100 kDa</sub>) ausgewertet.

Im Bezug auf die 60 kDa-Bande konnte für das NCLX-Expressionslevel der hSOD1G93A-Gruppe (n = 3;  $0,1 \pm 0,01$ ) eine signifikante Erniedrigung gegenüber der hSOD1WT-Gruppe (n = 3;  $0,6 \pm 0,01$ ) gezeigt werden (T-Test,  $p < 0,001$ ). Abbildung 6 A. stellt die relative NCLX<sub>60 kDa</sub>-Expression zwischen beiden Genotypen dar. In den NSC34-Kulturen ließ sich eine zweite NCLX-Bande bei etwa 100 kDa feststellen, deren Expressionsanalyse in Abbildung 6 B. zu sehen ist. Ähnlich wie bei der 60 kDa-Bande fand sich auch hier eine signifikant geringere NCLX<sub>100 kDa</sub>-Expression in der hSOD1G93A-Gruppe (n = 3;  $0,2 \pm 0,02$ ) im Vergleich zur hSOD1WT-Gruppe (n = 3;  $0,6 \pm 0,03$ ) (T-Test,  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend zeigten die Western Blot-Analysen eine ALS spezifische Erniedrigung der NCLX-Proteinlevel in NSC34-Zellen.

Für nähere Aussagen über die NCLX-Lokalisation und des Expressionsmusters sowie für eine quantitative Analyse auf Proteinniveau wurden primäre MN Co-Kulturen genutzt und immunhistochemischen Untersuchungsmethoden unterzogen. Dafür wurden 13. Tage alte MN mit Antikörpern gegen NCLX und SMI32 (spezifisch für MN) angefärbt. Unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop erfolgte die Erstellung von axialen Bildstapeln (z-Stacks) und die Quantifizierung der NCLX Expression in MN mit Hilfe der CTCF-Methode. Zur Standardisierung wurde das SMI32-Signal genutzt. Insgesamt wurden 52 MN aus der nicht-transgenen Gruppe mit 48 MN der hSOD1G93A-Gruppe aus drei verschiedenen Kulturansätzen miteinander verglichen.



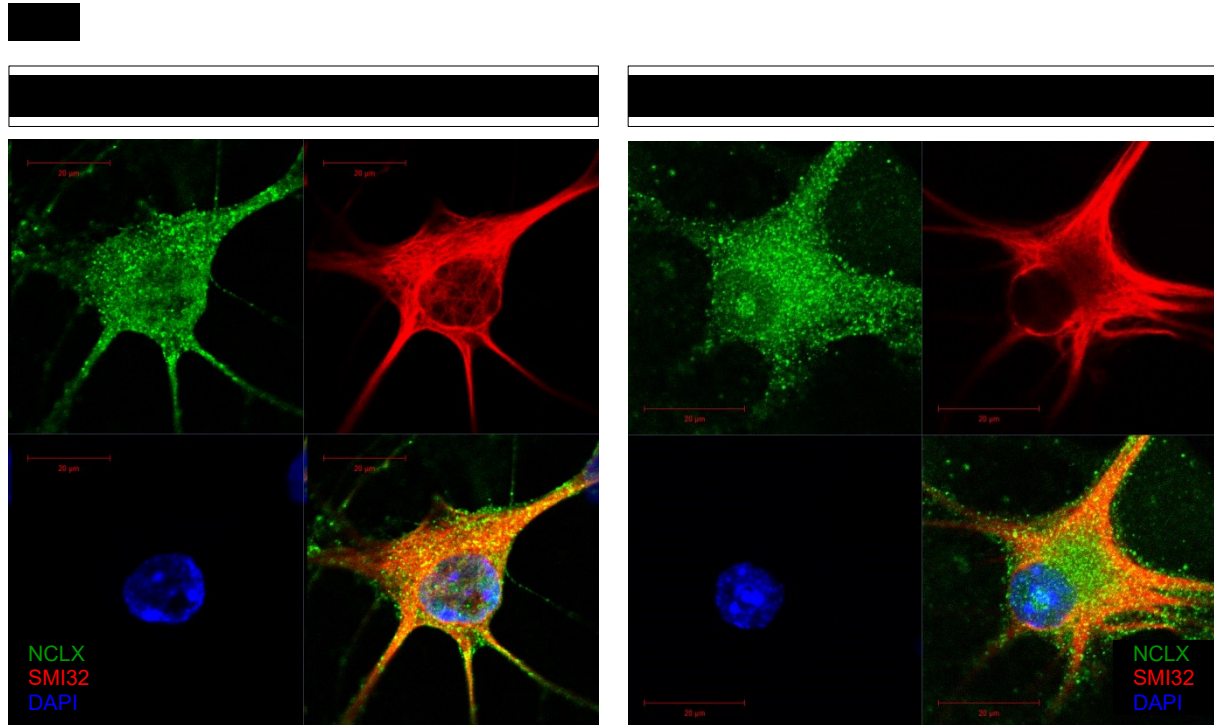
**Abbildung 6:** Vergleich der relativen NCLX-Expression in hSOD1WT- und hSOD1G93A-NSC34-Zellen.

Die Quantifizierung der relativen NCLX-Expression mittels Western Blot ergab sowohl bezogen auf **A.** die 60 kDa-Bande als auch auf **B.** die 100 kDa-Bande eine signifikante Erniedrigung der NCLX-Expressionslevel in der hSOD1G93A-Gruppe gegenüber der hSOD1WT-Gruppe. \*\*\*  $p < 0,001$ .

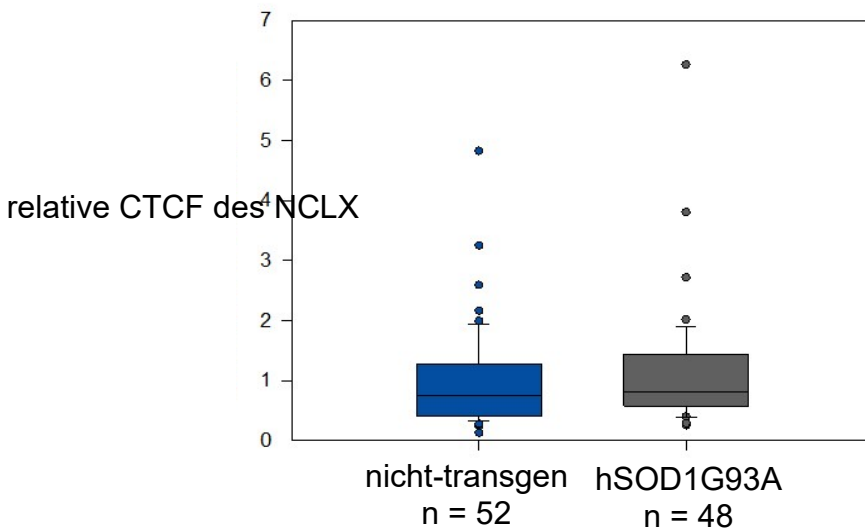
In Abbildung 7 A. ist beispielhaft ein am Konfokalmikroskop gescanntes 2D-Bild eines nicht-transgenen sowie eines hSOD1G93A-MN dargestellt. Die Färbung zeigt die Lokalisation der NCLX-Expression vorrangig in den Zellsomata, aber auch in den Zellfortsätzen sowie in den Nucleoli. Im Bereich des Zellkerns wurde ein deutlich schwächeres Signal des NCLX detektiert.

Zwischen MN der nicht-transgenen ( $n = 52$ ;  $0,99 \pm 0,83$ ) und hSOD1G93A-Gruppe ( $n = 48$ ;  $1,1 \pm 1,0$ ) war kein signifikanter Unterschied in der relativen CTCF des NCLX festzustellen (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p = 0,31$ ). Die Abbildung 7 B. zeigt das dazugehörige Boxplot mit dem Median (nicht-transgen: 0,8; hSOD1G93A: 0,8), der 25. (nicht-transgen: 0,4; hSOD1G93A: 0,6) und

75. Quantile (nicht-transgen: 1,3; hSOD1G93A: 1,5) sowie die maximalen (nicht-transgen: 4,8; hSOD1G93A: 6,3) und minimalen Werte (nicht-transgen: 0,1; hSOD1G93A: 0,3).



**B.**

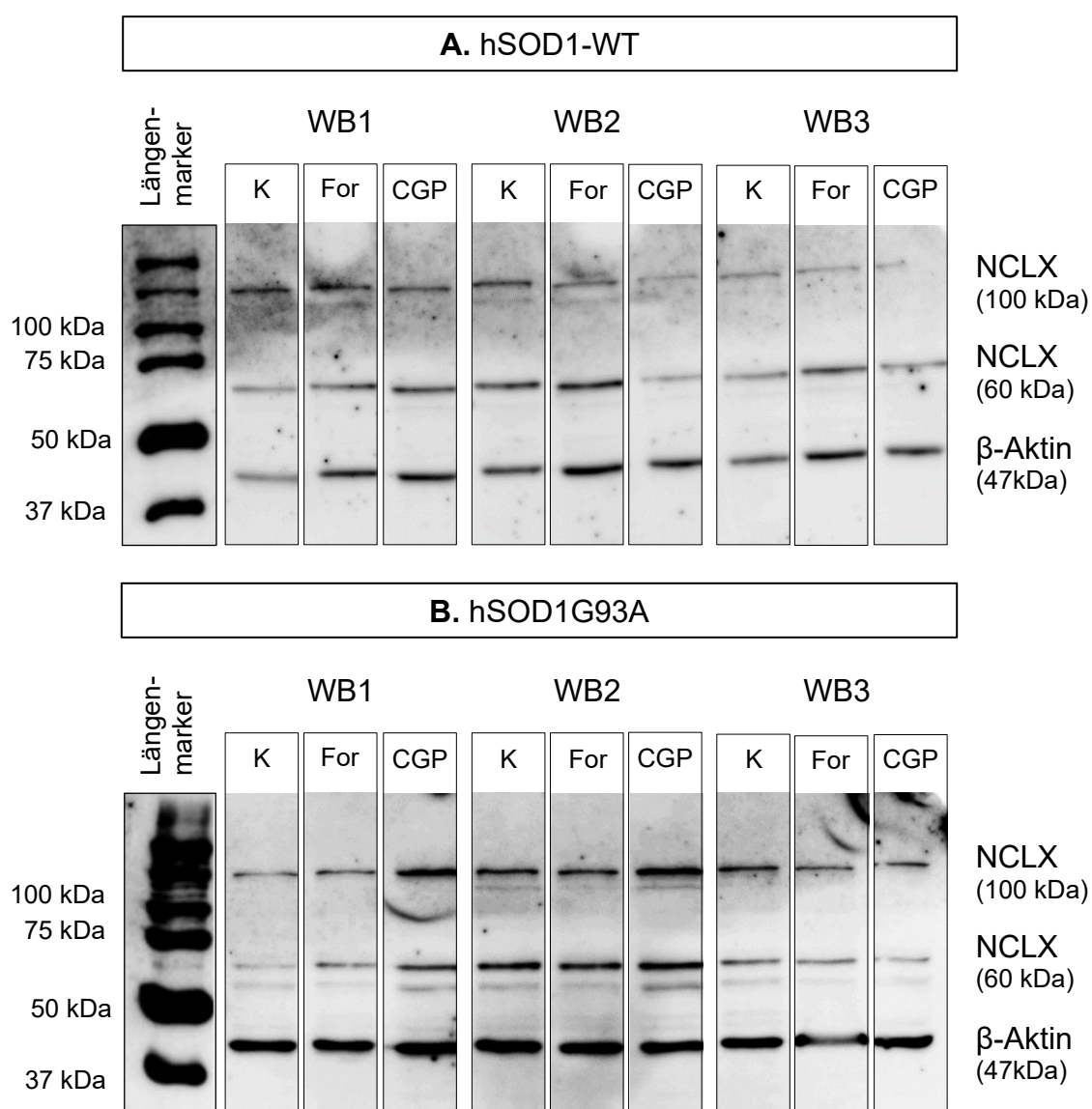


**Abbildung 7:** Lokalisation und Proteinniveau des NCLX in primären Motoneuron Co-Kulturen. **A.** Beispielhafte 2D-Bilder von Motoneuronen der nicht-transgenen und mutierten hSOD1G93A-Gruppe. Grün dargestellt ist das NCLX-Signal, rot das SMI32-Signal und blau die Zellkerne (Maßstab: 20 µm). **B.** Boxplot der relativen korrigierten Fluoreszenz der gesamten Zelle (CTCF) des NCLX in nicht-transgenen und hSOD1G93A-Motoneuronen. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der relativen CTCF des NCLX zwischen beiden Genotypen.



## 5.2 Modulation der NCLX-Expression durch den Aktivator Forskolin und Inhibitor CGP37157 in der Pathogenese der ALS

Als nächstes wurde der NCLX-Transporter in hSOD1WT- und hSDO1G93A-NSC34-Zellen durch die Applikation von Forskolin aktiviert bzw. durch den Zusatz von CGP37157 inhibiert. Im Anschluss erfolgte nach der Western Blot-Methode die Quantifizierung des Expressionslevels durch Messung der relativen NCLX-Bandendichte nach Normalisierung zur  $\beta$ -Aktin-Bande. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt und ein Durchschnittswert der relativen NCLX-Expression gebildet. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des Western Blots.

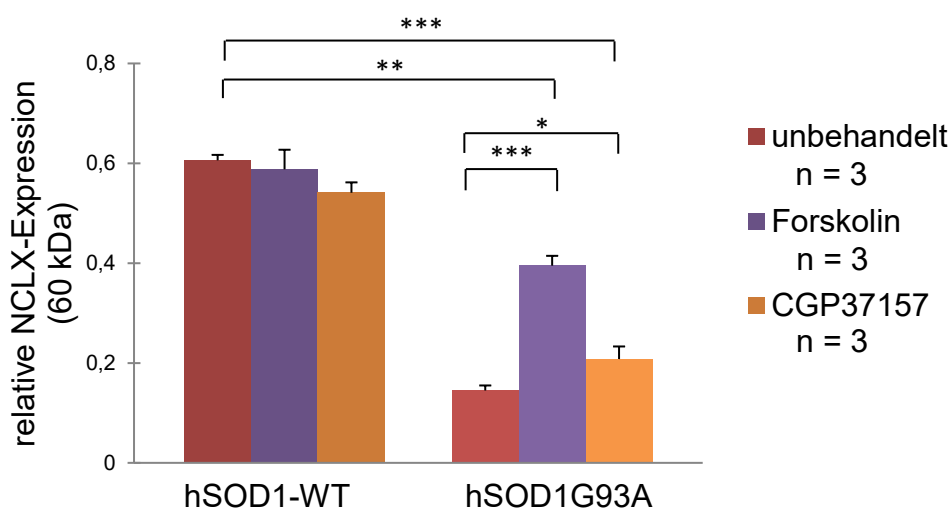


**Abbildung 8:** Western Blot zur Quantifizierung des NCLX-Expressionslevels. In NSC34-Zellen wurde die NCLX-Aktivität nicht moduliert (unbehandelt, K), mit Forskolin (For) induziert oder CGP37157 (CGP) inhibiert und die Expression in der **A.** hSOD1-WT-Gruppe und **B.** hSDO1G93A-Gruppe quantifiziert. Es zeigten sich zwei Proteinbanden bei ca. 60 kDa und 100 kDa.

### 5.2.1 Analyse der 60 kDa-Bande

In der hSOD1WT-Gruppe konnte weder nach Forskolin- ( $n = 3$ ;  $0,6 \pm 0,04$ ) noch nach CGP37157-Behandlung ( $n = 3$ ;  $0,5 \pm 0,02$ ) ein signifikanter Unterschied in der NCLX<sub>60 kDa</sub>-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden ( $n = 3$ ;  $0,6 \pm 0,01$ ) (ANOVA-Test,  $p = 0,07$ ).

Hingegen bewirkte in der hSOD1G93A-Gruppe sowohl Forskolin ( $n = 3$ ;  $0,4 \pm 0,02$ ) als auch CGP37157 ( $n = 3$ ;  $0,2 \pm 0,03$ ) eine signifikante Erhöhung des NCLX<sub>60 kDa</sub>-Proteinlevels gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $n = 3$ ;  $0,1 \pm 0,01$ ) (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Der direkte Vergleich zwischen den behandelten hSOD1G93A-Gruppen und der unbehandelten hSOD1WT-Gruppe zeigte sowohl für Forskolin als auch für CGP37157 eine weiterhin signifikant reduzierte NCLX<sub>60 kDa</sub>-Expression (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test, \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt Abbildung 9.



**Abbildung 9:** Relative NCLX-Expression der 60 kDa-Bande in der hSOD1-WT- und hSOD1G93A-Gruppe.

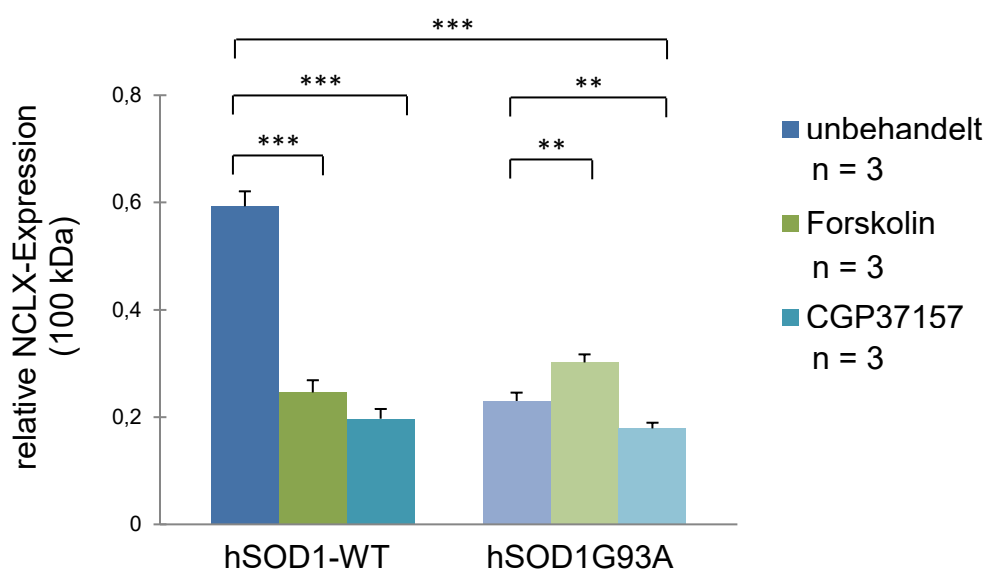
In der hSOD1-WT-Gruppe konnte weder nach Forskolin- noch nach CGP37157-Behandlung eine signifikante Veränderung der NCLX-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Die hSOD1G93A-Gruppe hingegen zeigte sowohl nach Forskolin- als auch nach CGP37157-Behandlung eine signifikant höhere NCLX-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (ANOVA-Test ggf. mit Holm-Sidak-Posthoc-Test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die NCLX-Proteinexpression ist nach Inkubation mit Forskolin (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test, \*\*  $p < 0,005$ ) und CGP37157 (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ) in der hSOD1G93A-Gruppe signifikant geringer als in der unbehandelten hSOD1-WT-Gruppe. Die Standardabweichung ist angegeben.

## 5.2.2 Analyse der 100 kDa-Bande

Die Quantifizierung der 100 kDa-Bande zeigte im Gegensatz zur 60 kDa-Bande ein signifikant erniedrigtes NCLX<sub>100 kDa</sub>-Expressionslevel in der unbehandelten hSOD1WT-Gruppe ( $n = 3; 0,6 \pm 0,03$ ) im Vergleich zu den mit Forskolin ( $n = 3; 0,2 \pm 0,02$ ) bzw. CGP37157 ( $n = 3; 0,2 \pm 0,02$ ) behandelten hSOD1WT-Zellen (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

In der hSOD1G93A-Gruppe ließ sich nach Forskolin-Applikation eine signifikant erhöhte ( $n = 3; 0,3 \pm 0,02$ ), nach CGP37157-Inkubation eine signifikant erniedrigte ( $n = 3; 0,2 \pm 0,01$ ) NCLX<sub>100 kDa</sub>-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $n = 3; 0,2 \pm 0,02$ ) nachweisen (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test; \*\*  $p < 0,005$ ). Die Forskolin-induzierte Erhöhung der NCLX<sub>100 kDa</sub>-Expression in der hSOD1G93A-Gruppe erreichte nicht das Ausgangsniveau der unbehandelten hSOD1WT-Gruppe (T-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ). Die Vergleiche der NCLX<sub>100 kDa</sub>-Expression nach Behandlung mit Forskolin oder CGP37157 ist in Abbildung 10 dargestellt.

Zusammenfassend konnte die Modulation der NCLX-Aktivität in der hSOD1WT-Gruppe das NCLX-Expressionslevel nicht beeinflussen, während es in der hSOD1G93A-Gruppe zu signifikanten Veränderungen kam. Die Applikation von Forskolin erhöhte das NCLX-Expressionslevel beider Banden, welches allerdings nicht das Ausgangsniveau der unbehandelten hSOD1WT-Gruppe erreichte. Forskolin ist somit in der Lage, die Expression von NCLX signifikant positiv zu beeinflussen. Die Zugabe des inhibierenden CGP37157 zeigte konträre Ergebnisse. Während es die Expression der 60 kDa-Bande ebenfalls erhöhen konnte, wurde das Expressionslevel der 100 kDa-Bande erniedrigt.



**Abbildung 10:** Relative 100 kDa NCLX-Expression in der hSOD1-WT- und hSOD1G93A-Gruppe.

In der hSOD1-WT-Gruppe bewirkte Forskolin und CGP37157 eine signifikante Erniedrigung der 100 kDa NCLX-Expression. Die hSOD1G93A-Gruppe hingegen zeigte nach Forskolin-Behandlung eine signifikante Erhöhung und nach CGP37157-Applikation eine signifikante Erniedrigung der 100 kDa-NCLX-Expression (ANOVA-Test mit Holm-Sidak-Posthoc-Test; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Die Forskolin induzierte Erhöhung der NCLX-Expression in der hSOD1G93A-Gruppe erreicht nicht das Ausgangsniveau der unbehandelten hSOD1-WT-Gruppe (T-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ). Die Standardabweichung ist angegeben.

### 5.3 Auswirkung von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration unter ruhenden und aktivierten Bedingungen

Unter Verwendung der *Calcium imaging*-Methode sollte der akute Effekt von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration näher beleuchtet werden, um Rückschlüsse auf die durch eine gestörte Calciumelimination der Mitochondrien bedingte Calciumdysregulation zu ermöglichen. Die Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta[Ca^{2+}]$ ) wurden unter Verwendung von zwei verschiedenen Applikationsprotokollen gemessen. Zunächst erfolgte die Applikation von Forskolin für eine definierte Zeit, was der Situation unter ruhenden Bedingungen entsprach. Des Weiteren wurde Kainat als Zellstimulator unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin appliziert, was einer Situation unter aktivierten Bedingungen entsprach. Mithilfe von Verapamil und Tetrodotoxin wurden spannungsgesteuerte Calciumkanäle der Zellmembran blockiert, sodass eine spontane Zellaktivität inhibiert wurde.

Abhängig vom Durchmesser der Zellsomata wurden die gemessenen Neurone den MN oder Nicht-MN zugeordnet.

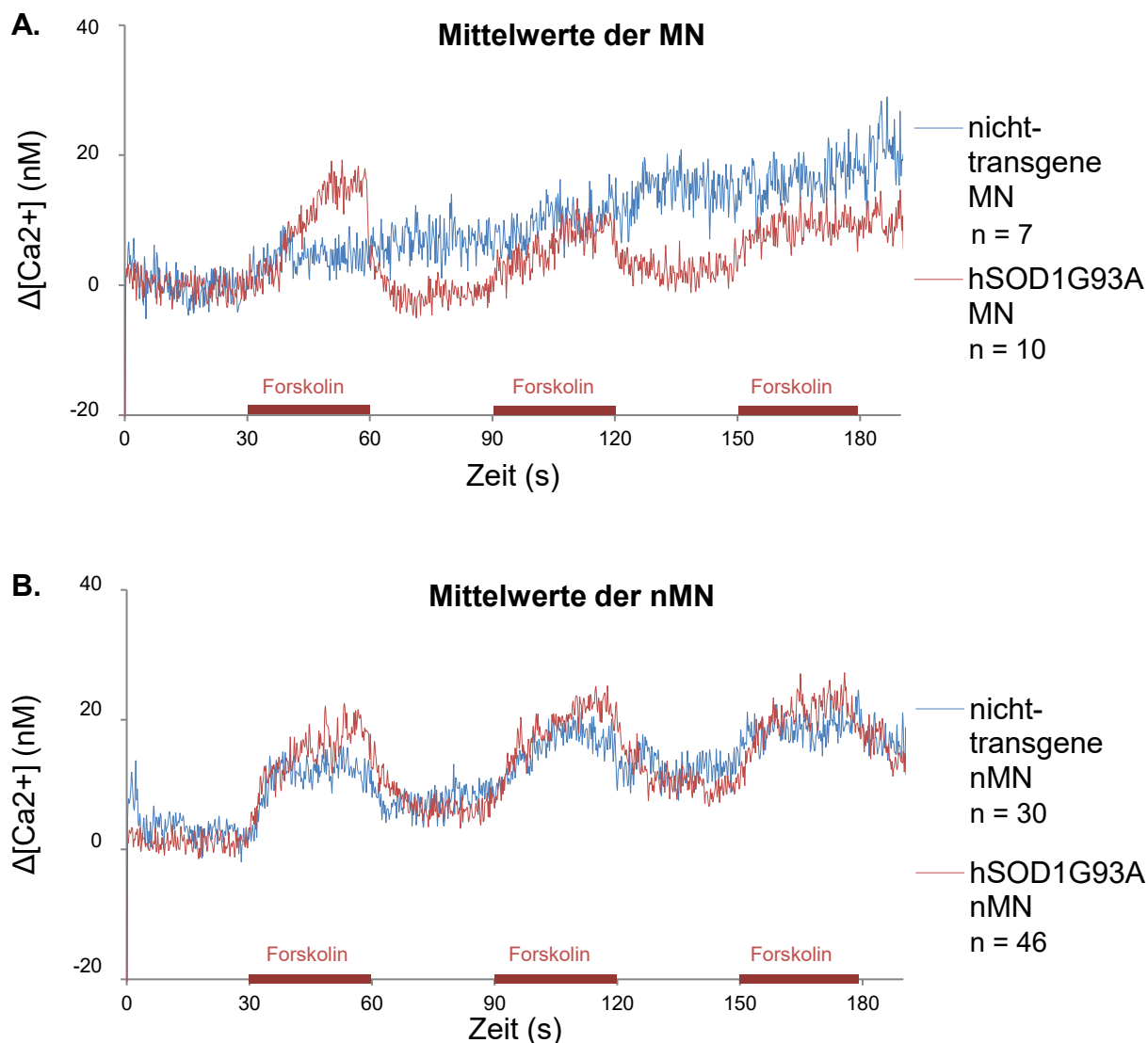
### **5.3.1 Auswirkung von Forskolin auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration unter ruhenden Bedingungen**

Um zunächst die akute Reaktion der Neurone auf Forskolin im Sinne einer Veränderung der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  zu testen, wurde abwechselnd erst für 30 s die Forskolin-freie Hintergrundlösung appliziert und dann für 30 s Forskolin zugesetzt (Protokoll A). Dieser Ablauf wurde drei Mal wiederholt. Die Abbildungen 11 A. und B. zeigen die Kurven der Mittelwerte der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  für MN und Nicht-MN (für eine Abbildung der einzelnen Messkurven siehe Anhang, Kapitel 9.1, Abbildung 20 A.-D.).

Dabei wurden Messwerte von 7 nicht-transgenen MN, 10 hSOD1G93A MN, 30 nicht-transgene nMN und 46 hSOD1G93A nMN herangezogen. In der Gruppe der Nicht-MN reagierten die Zellen bei Forskolin-Applikation mit einer Erhöhung der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ , während diese sich bei Forskolin-Abwesenheit wieder absenkte. Die basale Calciumkonzentration schien über die drei Forskolin-Applikationen hinweg anzusteigen. Abweichend davon ist bei der Kurve der MN bei erster Forskolin-Applikation eine gleichartige Veränderung der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  wie bei nMN zu erkennen, die darauffolgenden Forskolin-Applikationen führten hingegen zu keiner deutlichen  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung.

Um die Entwicklung der basale Calciumkonzentration bei nMN genauer zu analysieren, wurde im Folgenden für jede Zelle die Baseline, definiert als Mittelwert der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  innerhalb von 5 s vor einer Forskolin-Applikation, kalkuliert und innerhalb einer Gruppe verglichen (Abbildung 12 A.). Baseline 1 entspricht dabei dem Mittelwert vor der ersten Forskolin-Applikation, Baseline 2 vor der zweiten, Baseline 3 vor der dritten Applikation. Eine mit jeder Forskolin-Applikation steigenden Baseline würde für eine Störung der Mechanismen sprechen, die für die Wiederherstellung der basalen Calciumkonzentration zuständig sind. Sowohl unter den nicht-transgenen ( $n = 30$ ) als auch unter den hSOD1G93A nMN ( $n = 46$ ) ist eine Steigerung der Baseline mit jeder Forskolin-Applikation zu sehen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht-transgenen und hSOD1G93A-Gruppe bestand zwischen Baseline 1 und 2 sowie zwischen Baseline 1 und 3 (ANOVA on Ranks-Test mit Turkey-Posthoc-

Test; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Mittelwerte mit Standardabweichungen sind in Tabelle 7 angegeben.



**Abbildung 11:** Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation. In 30 s Abständen wurde der Hintergrundlösung Forskolin zugesetzt (rote Balken). Die Mittelwerte der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta[Ca^{2+}]$ ) der **A.** Motoneurone (MN) und **B.** Nicht-Motoneurone (nMN) ist dargestellt.

**Tabelle 7:** Mittelwerte der Baseline vor Forskolin-Applikation in Nicht-Motoneuronen ( $\pm$  Standardabweichung)

Nicht-Motoneurone	Baseline 1*	Baseline 2*	Baseline 3*
nicht-transgen	102,1 $\pm$ 4,6	109,0 $\pm$ 9,4	113,0 $\pm$ 13,2
hSOD1G93A	101,2 $\pm$ 5,0	106,6 $\pm$ 10,9	109,8 $\pm$ 17,4

\*Die Baseline ist definiert als Mittelwert aller gemessenen Calciumkonzentrationen innerhalb von 5 s vor jeder Forskolin-Applikation.

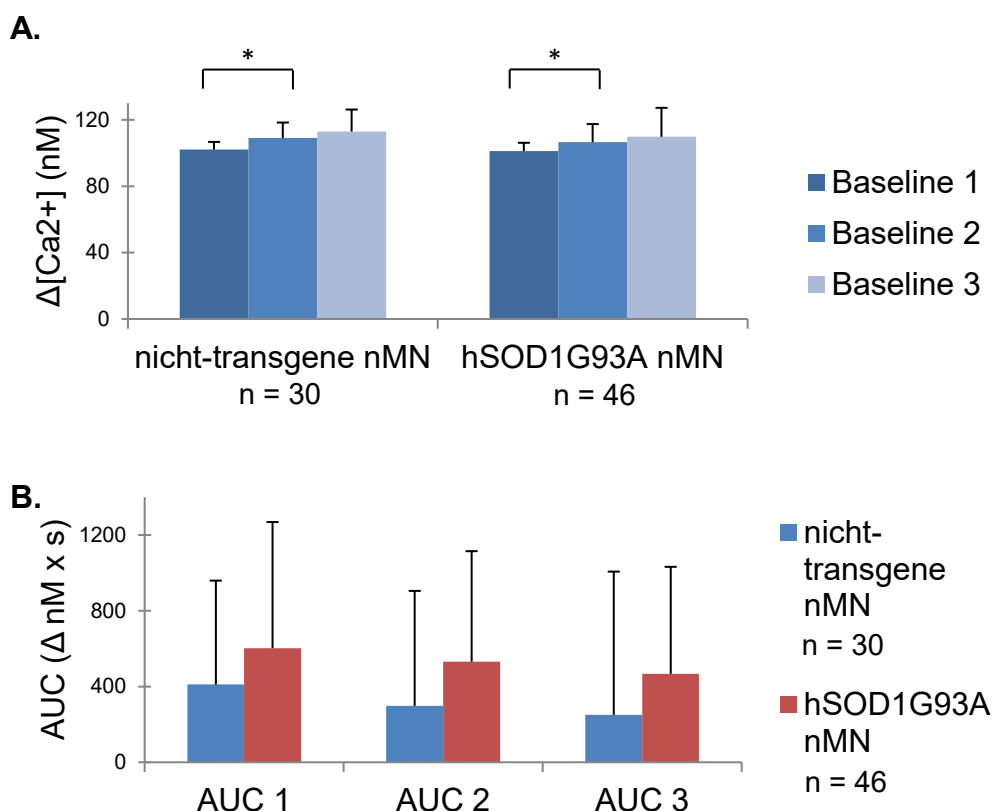
Nimmt man an, dass in der Matrix eine zu hohe Calciumkonzentration vorliegt, könnte nach Aktivierung der NCLX-Aktivität mit Forskolin die vermehrt ausströmende

Calciummenge eine höhere  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  generieren. Dies wurde durch die Berechnung des Integrals während einer 30 s andauernden Forskolinstimulation (AUC) untersucht. Der Vergleich der AUC 1 mit AUC 2 und AUC 3 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen der nMN (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 12 B.). Die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen sind in Tabelle 8 angegeben.

**Tabelle 8:** Mittelwerte der Calciummenge während einer Forskolin-Applikation in Nicht-Motoneuronen ( $\pm$  Standardabweichung)

Nicht-Motoneurone	AUC 1*	AUC 2*	AUC 3*
nicht-transgen	410,5 $\pm$ 548,7	297,9 $\pm$ 607,0	250,4 $\pm$ 756,5
hSOD1G93A	602,9 $\pm$ 665,7	531,4 $\pm$ 583,4	466,7 $\pm$ 565,4

\*AUC bezeichnet die zytosolische Calciummenge, die während einer 30-sekündigen Forskolin-Applikation gemessen wurde.



**Abbildung 12:** Baseline und AUC nach Forskolin-Applikation bei Nicht-Motoneuronen.

**A.** Der Mittelwert der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) innerhalb der 5 s vor jeder Forskolin-Applikation (Baseline) wurde innerhalb der Gruppen verglichen. Bei der nicht-transgenen Gruppe fand sich eine signifikante Erhöhung der Baseline 1 gegenüber Baseline 2 (ANOVA on Ranks-Test mit Turkey-Posthoc-test;  $* p < 0,05$ ) sowie zwischen Baseline 1 und 3 ( $*** p < 0,001$ ). Bei der hSOD1G93A-Gruppe konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung zwischen Baseline 1 und 2 ( $** p < 0,005$ ) sowie Baseline 1 und 3 ( $*** p < 0,001$ ) festgestellt werden. **B.** Das Integral während der 3 x 30 s-andauernden Forskolin-Applikation (AUC) wurde verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt wurde (Mann-Whitney-Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ). Die Standardabweichung ist angegeben.

In der Gruppe der MN wurde ebenfalls die Baseline und die AUC berechnet und zwischen nicht-transgener und hSOD1G93A-Gruppe verglichen, was in Abbildung 13 A. dargestellt wird. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen Baseline 1, Baseline 2 und Baseline 3 innerhalb einer Gruppe (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ). Tabelle 9 enthält die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichung.

**Tabelle 9:** Mittelwerte der Baseline vor Forskolin-Applikation in Motoneuronen ( $\pm$  Standardabweichung)

Motoneurone	Baseline 1*	Baseline 2*	Baseline 3*
nicht-transgen	99,1 $\pm$ 3,1	107,2 $\pm$ 9,9	114,5 $\pm$ 23,8
hSOD1G93A	99,2 $\pm$ 3,7	99,0 $\pm$ 5,5	102,9 $\pm$ 5,9

*\*Die Baseline ist definiert als Mittelwert aller gemessenen Calciumkonzentrationen innerhalb von 5 s vor jeder Forskolin-Applikation.*

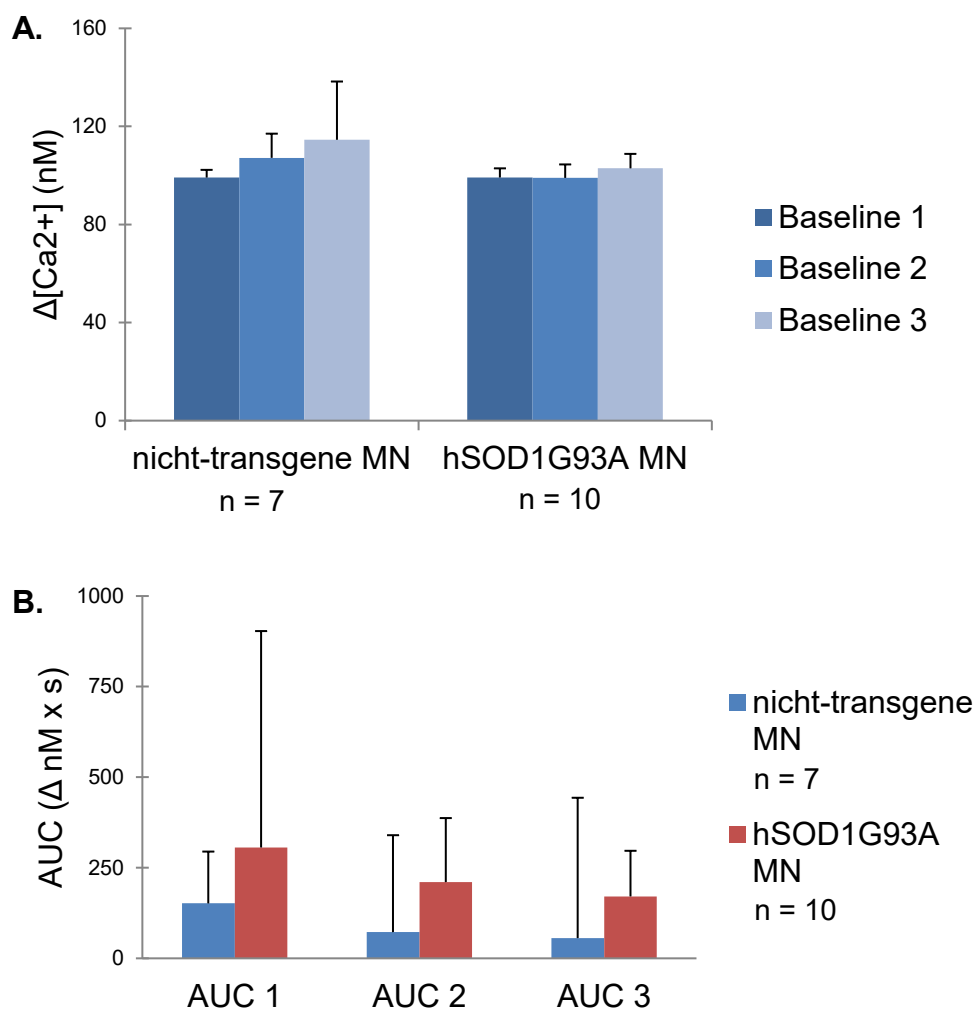
Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede bei der AUC 1, AUC 2 und AUC 3 zwischen den Genotypen festgestellt werden (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ) (Abbildung 13 B.). Die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen sind in Tabelle 10 angegeben.

**Tabelle 10:** Mittelwerte der Calciummenge während einer Forskolin-Applikation in Motoneuronen ( $\pm$  Standardabweichung)

Motoneurone	AUC 1*	AUC 2*	AUC 3*
nicht-transgen	151,8 $\pm$ 142,9	72,8 $\pm$ 267,3	56,0 $\pm$ 387,2
hSOD1G93A	306,1 $\pm$ 597,3	210,6 $\pm$ 176,6	171,1 $\pm$ 125,7

*\*AUC bezeichnet die zytosolische Calciummenge, die während einer 30-sekündigen Forskolin-Applikation gemessen wurde.*





**Abbildung 13:** Baseline und AUC nach Forskolin-Applikation in Motoneuronen.

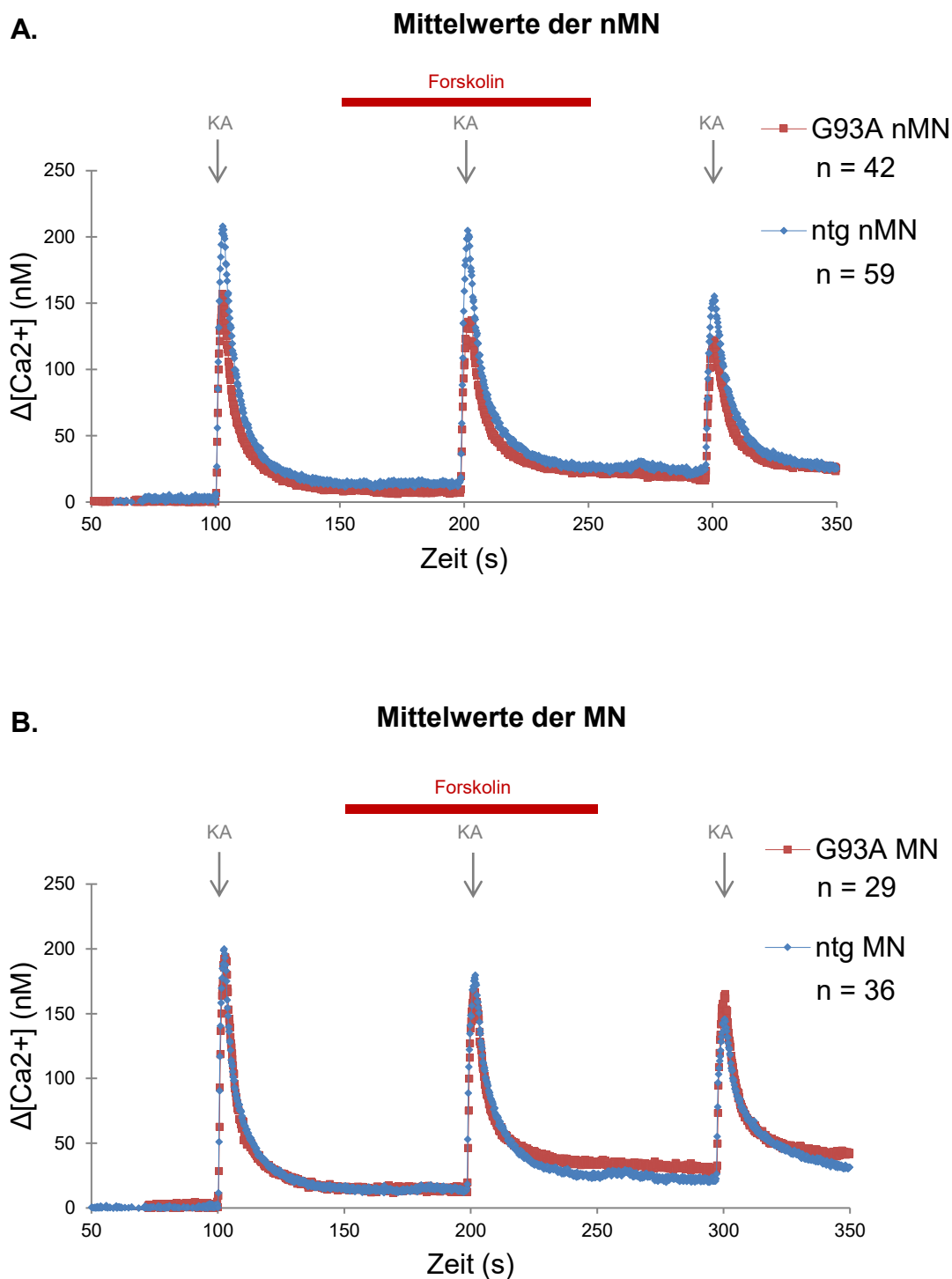
**A.** Der Mittelwert der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) innerhalb der 5 s vor jeder Forskolin-Applikation (Baseline) wurde innerhalb der Gruppen verglichen. Weder in der nicht-transgenen noch in der hSOD1G93A-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Baseline 1-3 festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ). **B.** Das Integral während der 3 x 30 s-andauernden Forskolin-Applikation (AUC) wurde verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden konnte (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p > 0,05$ ). Die Standardabweichung ist angegeben.

### 5.3.2 Auswirkung des NCLX-Aktivators Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration während einer Zellstimulation mit Kainat

Anhand eines zweiten *Calcium imaging*-Protokolls (Protokoll B) wurde in einer weiteren Messreihe die Auswirkung der Forskolin-Präsenz auf die  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  nach Stimulation der Zelle mit Kainat näher untersucht. Kainat bewirkt einen Calciumeinstrom in das Zytoplasma aus dem Extrazellulärraum über die Aktivierung des AMPA-R. Ziel des Experiments war es, die intrazelluläre Calciumdynamik nach einer Zellaktivierung unter gesteigerter NCLX-Aktivität durch Forskolin zu analysieren.

Dafür wurde aus den erhobenen Daten aus mindestens drei verschiedenen Kulturansätzen die maximale Calciumkonzentration (Peak 1-3), das Integral vom Zeitpunkt der Kainatstimulation bis 50 s danach (AUC 1-3) sowie die Zeitkonstante, definiert als Zeit der Reduktion der maximalen Calciumkonzentration auf 50 % (T 1-3) ermittelt. Es erfolgte ein Vergleich zwischen den vier Gruppen nicht-transgene Motoneurone (ntg MN, n = 36), nicht-transgene Nicht-Motoneurone (ntg nMN, n = 59), hSOD1G93A Motoneurone (G93A MN, n = 29) und hSOD1G93A Nicht-Motoneurone (G93A nMN, n = 42).

Die Abbildung 14 zeigt die Kurve der Mittelwerte der  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  von nMN und MN, wobei die Pfeile den Zeitpunkt einer 2 s andauernden Kainat-Stimulation angeben. 50 s vor und nach der zweiten Stimulation wurde der Hintergrundlösung Forskolin zugesetzt (roter Balken; eine Darstellung aller Messkurven ist für nMN in Abbildung 21 A.-D. ist im Anhang unter 10.1 zu finden).



**Abbildung 14:** Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation während einer Zellaktivierung.

Mittelwerte der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ ) sind in **A.** für Nicht-Motoneuronen (nMN) und **B.** für Motoneuronen (MN) dargestellt. Die Pfeile geben den Zeitpunkt einer 2 s-andauernden Kainat-Stimulation an. 50 s vor bis 50 s nach der zweiten Stimulation wurde Forskolin zugesetzt (roter Balken) (nicht-transgen, ntg; mutiertes hSOD1G93A, G93A)

Um eine Aussage über die gesamte Calciummenge, die nach Zellstimulation im Zytoplasma vorliegt, treffen zu können, wurde das Integral in Abwesenheit (AUC 1)

und Anwesenheit von Forskolin (AUC 2) kalkuliert und miteinander verglichen. Innerhalb der Subgruppen ntg MN, G93A MN und G93A nMN konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen AUC 1 und AUC 2 festgestellt werden. Tabelle 11 listet die dazugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichung auf. Ntg nMN zeigten allerdings eine signifikante Reduktion der AUC 2 ( $1370,2 \pm 104,36$ ) unter Anwesenheit von Forskolin gegenüber der AUC 1 ( $2070,5 \pm 146,73$ ) unter Abwesenheit von Forskolin, dargestellt in Abbildung 15 A (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $*p < 0,05$ ). Es ist jeweils der Standardfehler angegeben.

**Tabelle 11:** Mittelwerte der Calciummenge während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$  Standardabweichung)

	AUC 1* (ohne Forskolin)	AUC 2* (mit Forskolin)
nicht-transgene Motoneurone	$1219,5 \pm 187,8$	$1239,2 \pm 133,6$
hSOD1G93A Motoneurone	$1410,1 \pm 209,3$	$1107,9 \pm 148,9$
nicht-transgene Nicht-Motoneurone	$2070,5 \pm 146,7$	$1370,2 \pm 104,4$
hSOD1G93A Nicht-Motoneurone	$1007,6 \pm 173,9$	$952,0 \pm 123,7$

\*Die Calciummenge (AUC) bezeichnet das Integral 50 s vor bis 50 s nach einer Stimulation mit Kainat.

Ein Vergleich zwischen Peak 1 und 2 sollte Aufschluss darüber geben, ob Forskolin durch die Induktion der Calciumelimination aus den Mitochondrien Einfluss auf den intrazellulären Calciumanstieg nach Zellstimulation hat. Wie in Abbildung 15 B. zu sehen, fand sich in keines der Subgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ -Werten ohne Forskolin/Peak 1 und mit Forskolin/Peak 2 (Mann-Whitney-Rank sum-Test,  $p > 0,05$ ). Tabelle 12 zeigt die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichung.

**Tabelle 12:** Mittelwerte der maximalen Calciumkonzentration während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$  Standardabweichung)

	Peak 1* (ohne Forskolin)	Peak 2* (mit Forskolin)
nicht-transgene Motoneurone	224,8 $\pm$ 21,3	186,5 $\pm$ 18,4
hSOD1G93A Motoneurone	223,7 $\pm$ 23,7	178,1 $\pm$ 20,5
nicht-transgene Nicht-Motoneurone	247,5 $\pm$ 16,6	214,3 $\pm$ 14,4
hSOD1G93A Nicht-Motoneurone	169,2 $\pm$ 19,7	150,0 $\pm$ 17,0

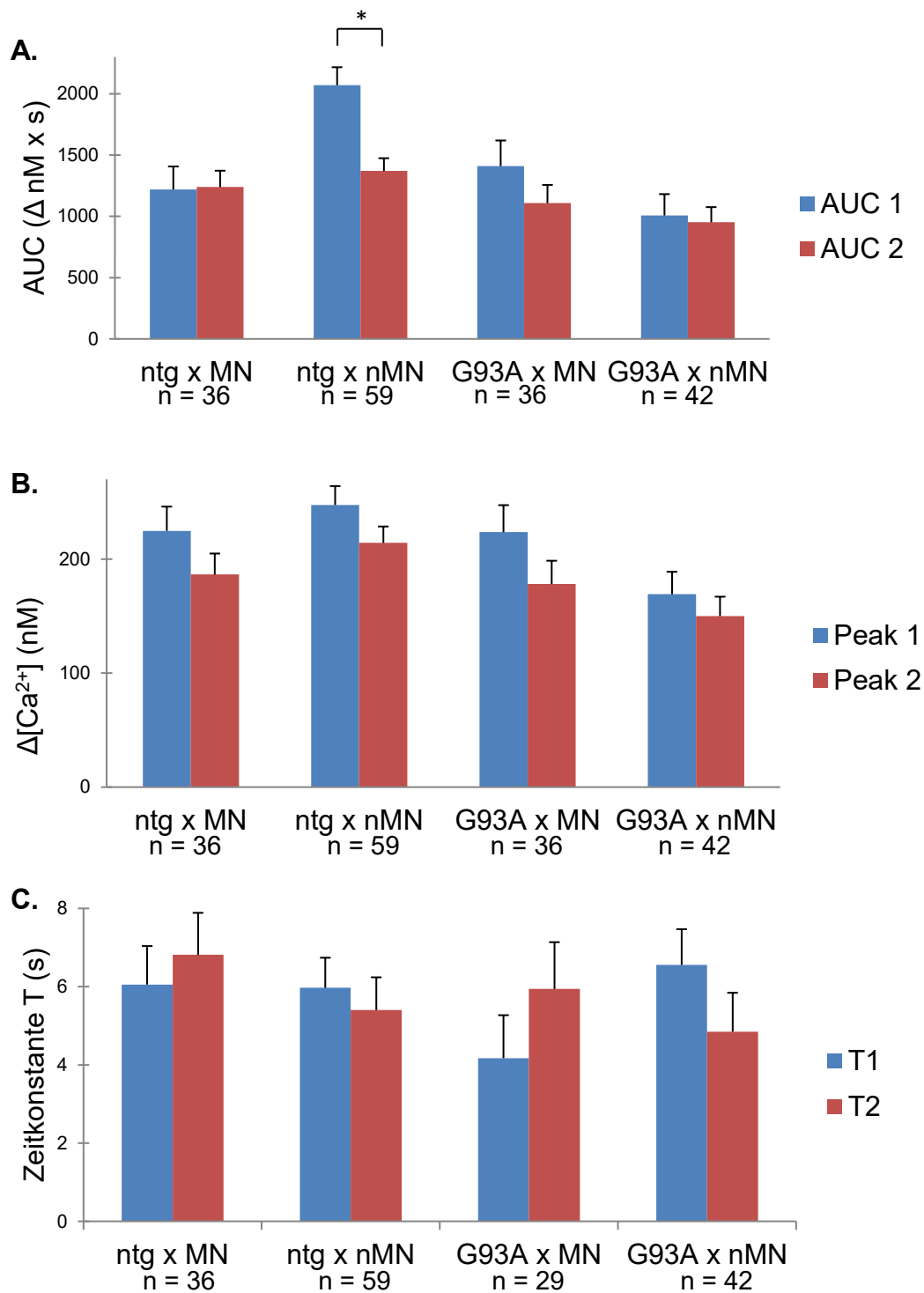
\*Die maximale Calciumkonzentration (Peak) bezeichnet den Abstand zwischen der Baseline und dem größten gemessenen Wert im Zeitraum zwischen 10 s vor bis 50 s nach einer Kainat-Stimulation.

Die Zeitkonstante T diene als Ausdruck für die Geschwindigkeit der Änderung der Calciumkonzentration, um Rückschlüsse auf die Calciumeliminationskapazität zu ziehen. In keines der vier Subgruppen gab es einen signifikanten Unterschied zwischen T 1 (ohne Forskolin) und T 2 (mit Forskolin), wie in Abbildung 15 C. deutlich wird (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ). Die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13:** Mittelwerte der Zeitkonstante während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$  Standardabweichung)

	T 1* (ohne Forskolin)	T 2* (mit Forskolin)
nicht-transgene Motoneurone	6,1 $\pm$ 1,0	6,8 $\pm$ 1,1
hSOD1G93A Motoneurone	4,2 $\pm$ 1,1	5,9 $\pm$ 1,2
nicht-transgene Nicht-Motoneurone	6,0 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,8
hSOD1G93A Nicht-Motoneurone	6,6 $\pm$ 0,9	4,8 $\pm$ 1,0

\*Die Zeitkonstante (T) gibt die Geschwindigkeit der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration während einer Kainat-Stimulation an.



**Abbildung 15:** Einfluss von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Zellstimulation.

**A.** Die AUC wurde als Integral zwischen dem Beginn der Kainat-Stimulation bis 50 s danach berechnet. Innerhalb der Subgruppen nicht-transgene Motoneurone (ntg MN), hSOD1G93A MN (G93A MN) und hSOD1G93A Nicht-Motoneurone (G93A nMN) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen AUC 1 und AUC 2 festgestellt werden. Nicht-transgene nMN zeigten allerdings eine signifikante Reduktion der AUC 2 gegenüber der AUC 1 (Mann-Whitney Rank Sum-Test, \*  $p < 0,05$ ). **B.** Beim Vergleich der maximalen Calciumkonzentration (Peak) während einer Kainat-Stimulation fand sich in keines der Subgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen Peak 1 (ohne) und Peak 2 (mit Forskolin) (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ). **C.** Auch bei der Zeitkonstante (T) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen T 1 (ohne Forskolin) und T 2 (mit Forskolin) nach einer Zellstimulation mit Kainat (Mann-Whitney Rank Sum-Test,  $p > 0,05$ ). Der Standardfehler ist angegeben.

Zusammenfassend scheint die Erhöhung der NCLX-Aktivität keinen Einfluss auf die Änderungen intrazellulärer Calciumkonzentrationen während einer Zellstimulation in MN bei ALS zu haben.

#### **5.4 Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben in der Pathogenese der ALS**

Das Überlebensassay diente der Beurteilung des Effekts einer Applikation des NCLX-Agonisten Forskolin bzw. -Inhibitors CGP37157 auf das Überleben von MN in der Pathogenese der ALS. Dafür erfolgte die Inkubation der MN Co-Kulturen am 13. Tag *in vitro* mit Forskolin als indirekten Aktivator des NCLX, CGP37157 als NCLX-Inhibitor, Kainat zur Induktion eines exzitotoxischen Milieus oder eine Kombination aus Kainat und eines NCLX-Modulators. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Eine immunhistochemische Markierung der Neuronen im Allgemeinen durch  $\beta$ III-Tubulin-Antikörper bzw. der MN im Speziellen mit SMI32-R-Antikörper erlaubte das manuelle Auszählen überlebender Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop nach entsprechender Zellfixierung.

Pro Gruppe und Behandlung wurden jeweils drei Deckgläser aus drei unterschiedlichen Kulturansätzen zur statistischen Auswertung herangezogen. Hierbei wurden die absoluten Zellzahlen der gesamten neuronalen Population (N), der Motoneurone im Speziellen (MN) sowie der Nicht-Motoneurone (nMN; Neurone, die nicht mit SMI32-R-Antikörper anfärben waren) und die prozentualen Anteile der MN bzw. nMN an N zwischen nicht-transgener und hSOD1G93A-Gruppe verglichen.

##### **5.4.1 Einfluss von Kainat auf das neuronale Zellüberleben**

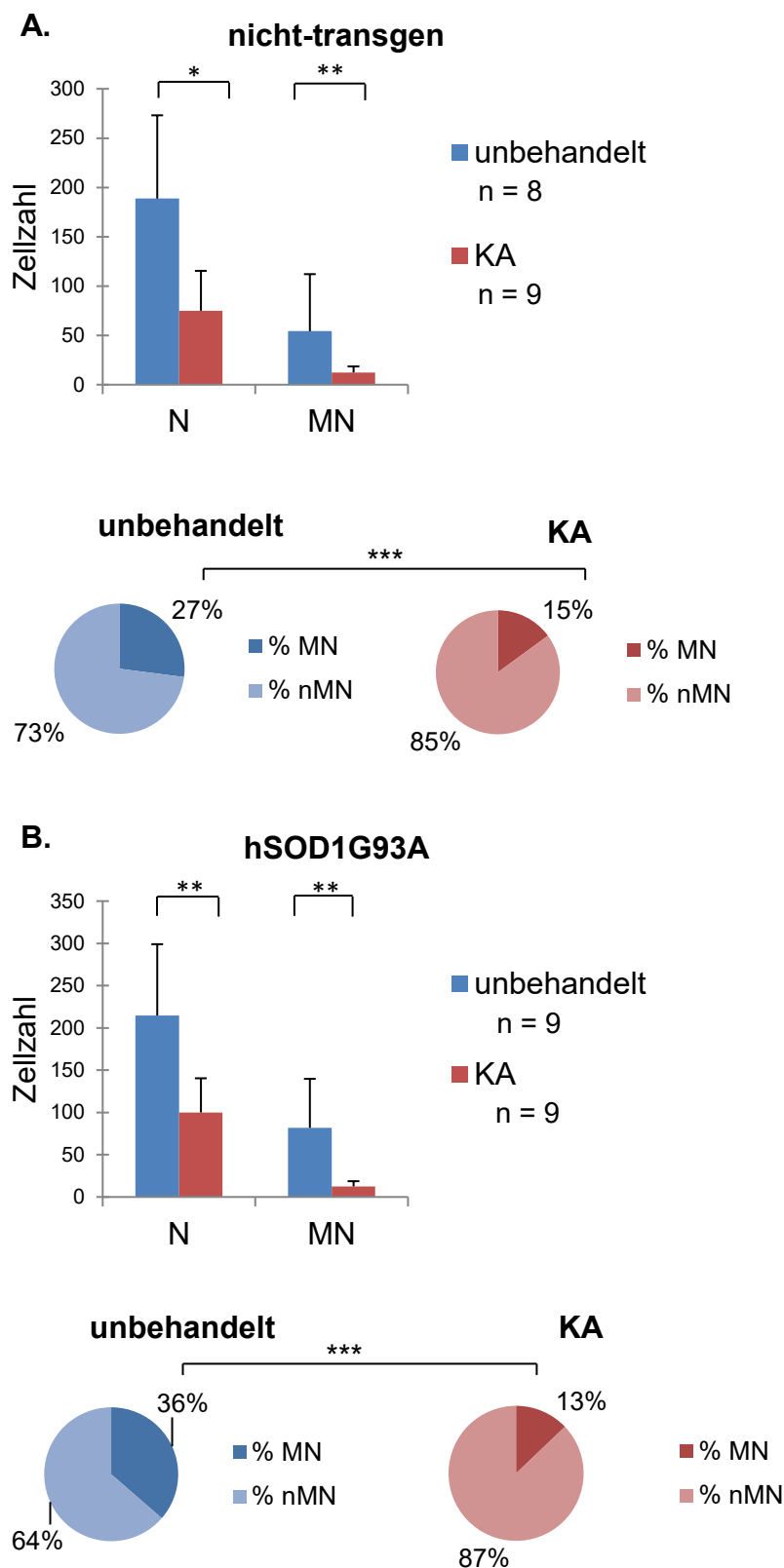
Zunächst wurde der toxische Effekt von Kainat auf das neuronale Überleben, als Voraussetzung für die Interpretation des Experiments überprüft. Für alle drei genannten Zellgruppen (N, MN, nMN) ergab sich in der nicht-transgenen und hSOD1G93A-Gruppe eine signifikante Reduktion der absoluten Zellzahlen nach Behandlung mit Kainat (T-Test, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ). Betrachtet man die prozentuale Verteilung der neuronalen Subtypen, liegt nach Kainat-Exposition ein signifikant größerer Anteil an nMN vor als unter unbehandelten Bedingungen und entsprechend ein signifikant kleinerer MN-Anteil (T-Test, \*  $p < 0,001$ ). Eine Übersicht

dieser Ergebnisse ist in Abbildung 16 zu sehen. Die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichung sind in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 14:** Mittelwerte der Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Kainat-Behandlung ( $\pm$  Standardabweichung)

	nicht-transgen		hSOD1G93A	
	unbehandelt	Kainat	unbehandelt	Kainat
Neurone (N)	188,75 $\pm$ 96,387	75,0 $\pm$ 51,4	214,7 $\pm$ 84,4	100,0 $\pm$ 40,4
Motoneurone (MN)	54,25 $\pm$ 36,362	12,4 $\pm$ 11,1	81,9 $\pm$ 57,9	12,6 $\pm$ 6,1
Nicht-Motoneurone (nMN)	134,5 $\pm$ 61,265	62,6 $\pm$ 40,8	132,8 $\pm$ 40,5	87,4 $\pm$ 36,9
prozentualer Anteil der MN	27,044 $\pm$ 5,113	14,9 $\pm$ 5,5	36,4 $\pm$ 12,1	12,9 $\pm$ 4,8
prozentualer Anteil der nMN	72,956 $\pm$ 5,113	85,1 $\pm$ 5,5	63,6 $\pm$ 12,1	87,1 $\pm$ 4,8





**Abbildung 16:** Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Kainat-Exposition. In der A. nicht-transgenen und B. hSOD1G93A-Gruppe fand sich sowohl in der Gesamtheit aller Neurone (N) also auch unter den Motoneuronen (MN) nach Behandlung mit Kainat (KA) allein eine signifikante Reduktion der Zellzahlen (T-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ). In beiden Gruppen war der prozentuale Anteil von MN (% MN) signifikant erniedrigt (T-Test, \*\*\*  $p < 0,001$  für beide Vergleiche).

#### 5.4.2 Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben

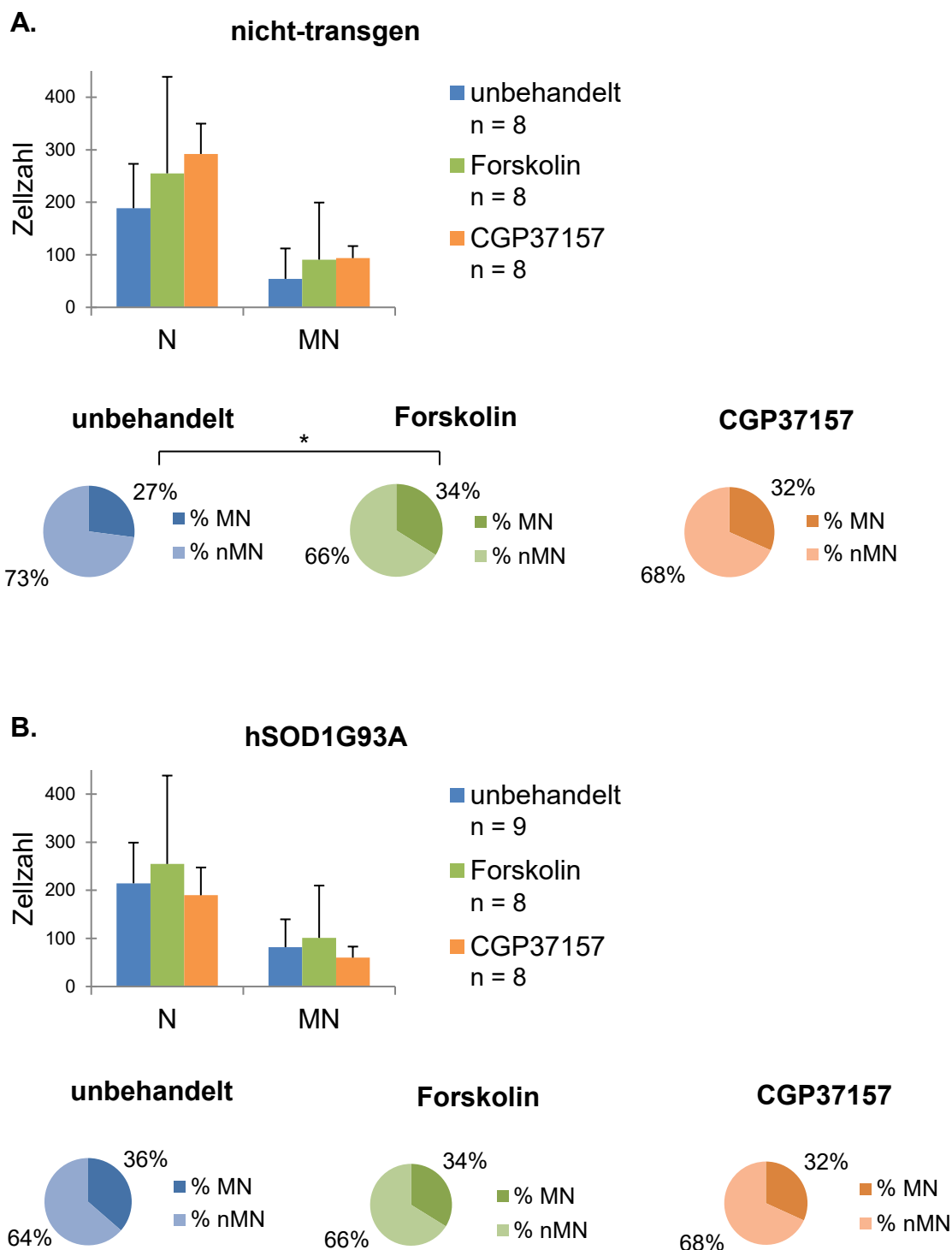
Zur Analyse des Einflusses von Forskolin und CGP37157 auf das neuronale Zellüberleben wurden die absoluten Zellzahlen und der prozentuale Anteil an MN bzw. nMN zwischen den unbehandelten und behandelten Kulturen verglichen.

Hierbei zeigten sich in der nicht-transgenen Gruppe eine Tendenz zur Erhöhung der Zellzahlen in allen drei Zellgruppen nach der Behandlung mit Forskolin sowie eine Erhöhung nach der Behandlung mit CGP37157 im Vergleich zur Kontrolle. Beide Veränderungen waren nicht signifikant (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ). Der prozentuale Anteil überlebender, nicht-transgener MN nach Forskolin-Exposition war hingegen signifikant höher im Vergleich zu den unbehandelten, nicht-transgenen MN. Entsprechend verringerte sich signifikant der prozentuale Anteil der nMN durch die Präsenz von Forskolin im Vergleich zur Kontrolle (ANOVA-Test,  $p < 0,05$ ). Nach Behandlung mit CGP37157 ergab auch die Betrachtung der prozentualen Anteile keine signifikanten Unterschiede.

In der hSOD1G93A-Gruppe fanden sich weder beim Vergleich der absoluten Zellzahlen (in N, MN und nMN) noch beim Vergleich prozentualer Anteile (in MN und nMN) signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit Forskolin oder CGP37157 inkubierten Zellen (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ). In Tabelle 15 sind jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung beider Genotypen aufgelistet. Die Ergebnisse beider Gruppe sind in Abbildung 17 zusammengefasst.

**Tabelle 15:** Mittelwerte der Zellzahlen und prozentualen Anteile nach NCXL-Modulation ( $\pm$  Standardabweichung)

	nicht-transgen			hSOD1G93A		
	un-behandelt	Forskolin	CGP-37157	un-behandelt	Forskolin	CGP-37157
Neurone (N)	188,8 $\pm$ 96,4	255,1 $\pm$ 145,9	292 $\pm$ 193,2	214,7 $\pm$ 84,4	254,8 $\pm$ 183,7	189,8 $\pm$ 57,7
Motoneurone (MN)	54,3 $\pm$ 36,4	90,9 $\pm$ 62,8	93,8 $\pm$ 63,8	81,9 $\pm$ 57,9	101,3 $\pm$ 108,6	60,1 $\pm$ 22,9
Nicht-Motoneurone (nMN)	134,5 $\pm$ 61,3	164,3 $\pm$ 84,903	198,3 $\pm$ 131,0	132,8 $\pm$ 40,5	153,5 $\pm$ 79,4	129,6 $\pm$ 42,2
prozentualer Anteil der MN	27,0 $\pm$ 5,1	33,9 $\pm$ 4,7	31,6 $\pm$ 3,1	36,4 $\pm$ 12,1	33,8 $\pm$ 12,4	31,8 $\pm$ 8,2
prozentualer Anteil der nMN	73,0 $\pm$ 5,1	66,1 $\pm$ 4,7	68,4 $\pm$ 3,1	63,6 $\pm$ 12,1	66,2 $\pm$ 12,4	68,2 $\pm$ 8,2



**Abbildung 17:** Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Forskolin- oder CGP37157-Exposition.

**A.** Sowohl in der Gesamtheit aller nicht-transgenen Neurone (N) als auch unter den nicht-transgenen Motoneuronen (MN) bewirkte die Behandlung mit Forskolin oder CGP37157 allein keine signifikanten Unterschiede in den absoluten Zellzahlen (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ). Es zeigte sich nach Forskolin-Behandlung ein signifikant höherer prozentualer Anteil an nicht-transgenen MN und entsprechend ein signifikant erniedrigter Anteil an nMN (ANOVA-Test,  $*p < 0,05$ ). **B.** Sowohl in der Gesamtheit aller hSOD1G93A Neurone also auch unter den hSOD1G93A MN und nMN bewirkte die Behandlung mit Forskolin oder CGP37157 keine signifikante Veränderung der absoluten Zellzahlen und prozentualen Anteile (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ). Die Standardabweichung ist angegeben.

### 5.4.3 Einfluss von Forskolin und CGP37157 auf das Zellüberleben nach Kainat-induzierter Exzitotoxizität

Da in der ALS die Exzitotoxizität einen wichtigen Beitrag zur Neurodegeneration leistet, sollte durch die zusätzliche Behandlung mit Kainat, einem Aktivator des AMPA-R, eine ständige Zellaktivierung simuliert werden, die zu einer Calcium-Überladung führt und einen Zelluntergang induziert. Die gleichzeitige Applikation von Forskolin oder CGP37157 mit Kainat diente der Bewertung ihres neuroprotektiven Einflusses unter exzitatorischen Bedingungen. Daher wurde in der dritten Vergleichsreihe das Zellüberleben nach alleiniger Kainat-Inkubation dem Zellüberleben nach kombinierter Behandlung gegenüber gestellt. In Abbildung 18 sind die Vergleiche der absoluten Zellzahlen sowie der prozentualen Anteile an MN/nMN aus der nicht-transgenen und hSOD1G93A-Gruppe zusammengefasst. Tabelle 16 beinhaltet die entsprechenden Mittelwerte mit Standardabweichungen.

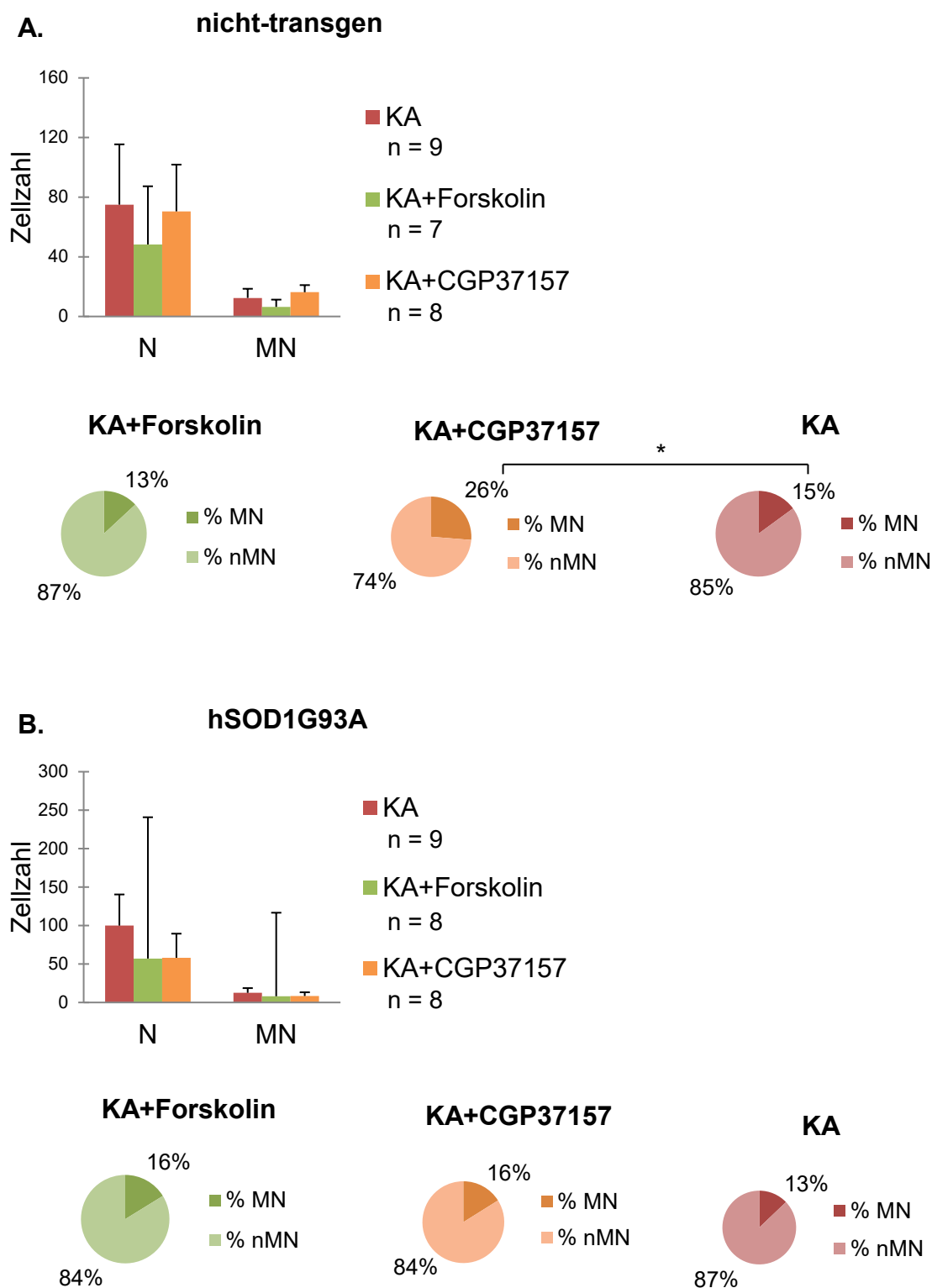
Das Zellüberleben in der nicht-transgenen Gruppe veränderte sich durch die Behandlung mit Kainat in Kombination mit dem Aktivator Forskolin sowie in Kombination mit dem Inhibitor CGP37157 nicht signifikant im Vergleich zur alleinigen Kainat-Inkubation (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ). Der prozentuale Anteil der MN erhöhte sich signifikant nach Zusatz von CGP37157 zu Kainat. Entsprechend gegensätzlich verhielten sich die die prozentualen Anteile der nMN (ANOVA-Test,  $p < 0,05$ ) für beide Vergleiche. Unter Forskolin fanden sich diese Veränderungen nicht (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ).

Bei allen drei Zelltypen der hSOD1G93A-Gruppe wurden keine signifikanten Veränderungen der Zellzahlen sowie der prozentualen Anteile nach kombinierter Kainat-Exposition mit Forskolin oder CGP37157 im Vergleich zur alleinigen Kainat-Inkubation gemessen (ANOVA-Test,  $p > 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigte die Applikation von Forskolin zur Aktivierung des NCLX oder CGP37157 zur Inhibition des NCLX keinen positiven Einfluss für das neuronale Überleben, weder unter normalen Bedingungen noch bei exzitotoxischem Milieu. Auch ein toxischer Effekt ließ sich nicht nachweisen.

**Tabelle 16:** Mittelwerte der Zellzahlen und prozentualen Anteile nach Kainat- und kombinierter Kainat-Behandlung ( $\pm$  Standardabweichung)

	nicht-transgen			hSOD1G93A		
	Kainat	Kainat + Forskolin	Kainat + CGP37157	Kainat	Kainat + Forskolin	Kainat + CGP37157
Neurone (N)	75,0 $\pm$ 51,4	48,3 $\pm$ 19,4	58,1 $\pm$ 31,3	100,0 $\pm$ 40,4	57,1 $\pm$ 39,0	58,1 $\pm$ 31,3
Motoneurone (MN)	12,4 $\pm$ 11,1	6,4 $\pm$ 3,1	8,5 $\pm$ 4,8	12,6 $\pm$ 6,1	8,1 $\pm$ 4,9	8,5 $\pm$ 4,8
Nicht- Motoneurone (nMN)	62,6 $\pm$ 40,8	41,5 $\pm$ 16,7	49,6 $\pm$ 29,6	87,4 $\pm$ 36,9	49 $\pm$ 34,5	49,6 $\pm$ 29,6
prozentualer Anteil der MN	14,9 $\pm$ 5,5	13,1 $\pm$ 3,1	26,3 $\pm$ 12,2	12,9 $\pm$ 4,8	16,2 $\pm$ 7,1	16,1 $\pm$ 9,8
prozentualer Anteil der nMN	85,1 $\pm$ 5,5	86,9 $\pm$ 3,1	73,7 $\pm$ 12,2	87,1 $\pm$ 4,8	83,8 $\pm$ 7,1	83,9 $\pm$ 9,8



**Abbildung 18:** Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Behandlung mit Kainat in Kombination mit Forskolin oder CGP37157.

In der **A.** nicht-transgenen Gruppe veränderten sich die Zellzahlen in der Gesamtheit aller nicht-transgenen Neurone (N) und der Motoneuronen (MN) nicht signifikant nach Kainat-Applikation (KA) in Kombination mit Forskolin oder CGP37157 im Vergleich zur alleinigen KA-Behandlung (ANOVA-Test  $p > 0,05$ ). Der prozentuale Anteil der nicht-transgenen MN erhöhte sich signifikant bei Zusatz von CGP37157 mit KA (ANOVA-Test, \*  $p < 0,05$  für beide Vergleiche). **B.** In der hSOD1G93A-Gruppen fanden sich weder beim Vergleich der absoluten Zellzahlen noch beim Vergleich der prozentualen Anteile an MN signifikante Unterschiede zwischen kombinierter KA-Behandlung gegenüber alleiniger KA-Applikation (ANOVA-Test  $p > 0,05$ ). Die Standardabweichung ist angegeben.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Applikation von Forskolin erhöhte die intrazelluläre Calciumkonzentration in Motoneuronen

Um die Rolle des NCLX in der Pathogenese der ALS zu untersuchen, wurden die Auswirkungen der NCLX-Aktivierung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration analysiert. Eine Störung der Calciumelimination aus Mitochondrien könnte für die Dysregulation des ERMCC verantwortlich sein, sodass eine Erhöhung der mitochondrialen Calciumelimination möglicherweise die Calciumüberladung der Matrix und somit die mitochondriale Dysfunktion reduzieren könnte. Einen Hinweis auf eine gestörte mitochondriale Calciumelimination liefert eine Studie von 2003, bei der in hSDO1G93A MN eine stetig zunehmende mitochondriale Calciumkonzentration nach Zellstimulation gezeigt wurde, während sie in gesunden MN bis zum Erreichen eines Plateaus anstieg und folgend in einem Zeitraum von mehreren 100 Sekunden auf die Basalkonzentration abfiel. Dies indiziert pathologische Mechanismen, die die Calciumregulation der Mitochondrien so beeinträchtigen, dass eine Limitation der mitochondrialen Calciumaufnahme gestört wird (Vila et al. 2003). Die Ursache könnte in einer verminderten NCLX-Aktivität liegen. So wurde bei pharmakologischer Blockade des NCLX in HeLa-Zellen ebenfalls eine persistierende, erhöhte mitochondriale Calciumkonzentration gemessen, wenn zuvor größere Calciummengen aufgenommen wurden (De Marchi et al. 2014). Eine Inhibition des NCLX durch siRNA sowie eine pharmakologische Blockade durch CGP37157 in SH-SY5Y bzw. HEK293-Zellen rief eine Verminderung der mitochondrialen Calciumelimination und eine vergleichbare Persistenz erhöhter Calciumkonzentrationen in der Matrix nach Zellstimulation durch Glutamat hervor (Palty et al. 2010). Die Induktion der NCLX-Aktivität könnte der gestörten mitochondrialen Calciumelimination in ALS entgegenwirken, die in der vorliegenden Arbeit durch Forskolin erreicht werden sollte. Forskolin ist ein Induktor der Proteinkinase A. Die Aktivität des NCLX wird über PINK1 reguliert, indem PINK1 die Proteinkinase A aktiviert. Die Proteinkinase A phosphoryliert den NCLX und steigert dadurch den mitochondrialen Calciumausstrom (Kostic et al. 2015). Eine Applikation von Forskolin sollte demnach die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen, indem mitochondriale Speicher entleert werden. Diese Signaltransduktionskette wird durch



eine Studie an olfaktorischen Neuronen unterstützt, die eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Forskolin-Applikation nachweisen konnte (Otsuguro et al. 2005). Im Einklang damit stieg auch die in dieser Arbeit gemessene intrazelluläre Calciumkonzentration während einer Forskolin-Applikation in Neuronen des spinalen Vorderhorns an. Bei der differenzierten Analyse der neuronalen Subtypen zeigten die Messkurven gesunder MN im Vergleich zu gesunden Nicht-MN keinen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration als Reaktion auf die Forskolin-Applikation. Hingegen war eine stetig zunehmende Calciumkonzentration über die Dauer der gesamten Messung zu erkennen. Diese Beobachtung weist auf MN-spezifische Mechanismen in der Regulation des Calciumhaushaltes hin, die sich von anderen neuronalen Subtypen unterscheiden. Die Betrachtung der Reaktionen in hSOD1G93A MN zeigt 1.) einen Unterschied zur Reaktion der gesunden MN, was eine dysregulierte NCLX-Funktion unter Anwesenheit der SOD1-Mutation indiziert, und 2.) eine Reaktion vergleichbar mit der Reaktion in Nicht-MN. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die hSOD1G93A-Mutation pathophysiologische Veränderungen hervorruft, die zu einem Verlust der MN-spezifischen Eigenschaften in der Calciumregulation führen. So könnte die Akkumulation von mutiertem SOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien (Takeuchi et al. 2002) in einer Beeinträchtigung des NCLX und anderer mitochondrialer Calciumregulatoren resultieren. MN werden den spezifischen Anforderungen an eine reibungslose Calciumregulation nicht mehr gerecht und degenerieren.

In einer zusätzlichen Versuchsreihe sollten die Auswirkungen einer verstärkten NCLX-Funktion in MN während einer Zellaktivierung durch Kainat, einem Aktivator des AMPA-R, ermittelt werden. Physiologisch steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Zellaktivierung steil an, erreicht einen maximalen Wert und kehrt zunächst schnell, dann mit abnehmender Geschwindigkeit auf das Ausgangsniveau zurück (Grosskreutz et al. 2007). Die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration wurden anhand von drei Parametern analysiert: Der maximale Anstiegswert der Calciumkonzentration, die Zunahme der Calciummenge und die Zeitkonstante, die die Geschwindigkeit der Abnahme der Calciumkonzentration definierte. Lautenschläger *et al.* zeigten, dass in hSOD1G93A MN im Vergleich zu gesunden MN die Calciumelimination nach Kainat-induziertem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verlangsamt ist (Lautenschlager et al. 2013). Dieser Unterschied konnte in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert

werden. Ein Grund könnte die dezente signifikante Abnahme der Zeitkonstante in hSOD1G93A MN sein, die erst durch sehr hohe Zellzahlen nachzuweisen ist.

Hinweise auf die Auswirkung von Forskolin auf die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zellaktivierung geben Studien, die die übergeordneten Regulationsebenen des NCLX modulierten. Unter Ausschaltung der PINK1-Expression (PINK1-Knockout) zeigte die Zellstimulation mit Glutamat in Neuronen eine gestörte mitochondriale Calciumregulation, sodass die aufgenommene Calciummenge in der Matrix verbleibt und nicht, wie physiologisch üblich kurze Zeit (5-10 s) nach Beginn der Glutamat-Applikation langsam absinkt. Zudem wurde unter PINK1-Suppression oder pharmakologischer Blockade des NCLX mittels CGP37157 eine verminderte mitochondriale Calciumelimination und ein vermindertes mitochondriales Membranpotenzial gemessen. Diese Effekte konnten durch die Applikation von Forskolin teilweise wiederhergestellt werden. So erhöhte Forskolin das erniedrigte Potenzial der Mitochondrienmembran sowie die Rate des mitochondrialen Calciumausstroms (in Neuroblastoma-Zellen: (Gandhi et al. 2009), in dopaminergen Neuronen: (Kostic et al. 2015)). Zu *et al.* zeigte ebenfalls unter fehlender NCLX-Expression einen höheren und schnelleren mitochondrialen Calciumanstieg nach Glucose induzierten Calciumtransienten sowie eine erhöhte ROS-Produktion in Endothelzellen der Ratte (Zu et al. 2015). Eine weitere Studie modifizierte direkt die Expression des NCLX und konnte eine Reduktion des Calciumanstiegs im Zytosol nach Stimulation des B-Zell-Rezeptors in B-Lymphozyten durch eine verminderte NCLX-Expression nachweisen. Diese war in NCLX-Knockout-Zellen vollständig unterdrückt. Der verminderte Anstieg resultierte aus dem reduzierten Calciumrücktransport aus Mitochondrien zum ER. Der Calciumgehalt im ER wird vermindert und es wird weniger Calcium aus dem ER-Speicher bei Aktivierung des B-Zell-Rezeptors freigesetzt. Zusätzlich konnte auch eine reduzierte Co-Lokalisation von Mitochondrien und ER festgestellt werden. Eine Überexpression des NCLX in B-Lymphozyten führte zu einer langsameren Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zellstimulation und einer schnelleren Abnahme der mitochondrialen Calciumkonzentration (Kim et al. 2012). Diese Forschungsergebnisse legen einen verstärkten Calciumanstieg sowie eine reduzierte Calciumelimination aus dem Zytosol nach Zellstimulation unter NCLX-Aktivierung nahe, da die in Mitochondrien aufgenommene Calciummenge schneller in das Zytosol zurückgeführt wird. In der vorliegenden Dissertation konnte diese Arbeitshypothese in MN nicht

bestätigt werden, die auf MN-spezifische Regulationsmechanismen des NCLX hindeuten. So führte in gesunden sowie hSOD1G93A MN die Applikation des NCLX-Aktivators Forskolin weder zu einem verstärkten Calciumanstieg - im Sinne einer Erhöhung der intrazellulären maximalen Calciumkonzentration und aufgenommener Calciummenge, noch zu einer reduzierten Calciumelimination aus dem Zytosol - im Sinne einer erhöhten Zeitkonstante nach Zellaktivierung. In der Gruppe der gesunden Nicht-MN wurde eine verminderte Calciummenge nach Zellaktivierung unter Forskolin-Applikation im Vergleich zur Abwesenheit von Forskolin gemessen, die in SOD1G93A Nicht-MN nicht nachgewiesen wurde.

Zusammenfassend zeigte sich eine Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration im Sinne eines geringen Calciumanstiegs durch die Zugabe von Forskolin in spinalen Neuronen, was die Funktion des NCLX als Calcium eliminierender Transporter des Mitochondriums bekräftigt. Gesunde MN scheinen sich in ihrer Verhaltensweise gegenüber Forskolin im Vergleich zu anderen neuronalen Subtypen abzuheben, was ihre Besonderheit bezüglich Zelltyp-spezifischer Mechanismen der Calciumregulation verdeutlicht. hSOD1G93A MN haben diese spezifischen Eigenschaften verloren. Veränderungen der Calciumdynamik nach Zellaktivierung unter NCLX-Induktion mittels Forskolin konnten in hSOD1G93A MN jedoch nicht eindeutig beobachtet werden. Der Einsatz spezifischerer NCLX-Aktivatoren oder die Kombination mit weiteren Modulatoren des ERMCC könnten die Effekte einer Erhöhung der NCLX-Aktivität auf die intrazelluläre Calciumkonzentration genauer analysieren. Simultane Messungen der intrazellulären und mitochondrialen Calciumkonzentration oder anderer Zellorganellen könnten in zukünftigen Studien Aufschlüsse über die Wege des Calciums nach Extrusion aus der Matrix geben.

## **6.2 Die Aktivierung oder Inhibition des NCLX-Transporters veränderte nicht das Überleben der Motoneurone**

Nachdem die Auswirkungen einer NCLX-Modulation auf die zelluläre Calciumkonzentration analysiert wurden, sollte in einem weiteren Experiment die Effekte einer NCLX-Aktivierung mittels Forskolin sowie eine NCLX-Inhibition durch CGP37157 auf das neuronale Zellüberleben untersucht werden. Hinweise für eine entscheidende Rolle des NCLX beim Zellüberleben zeigen mehrere Studien. So wurde unter PINK1-Suppression, einem Aktivator des NCLX, eine mitochondriale

Calciumüberladung und ein vermindertes Zellüberleben beobachtet (Gandhi et al. 2009, Parganlija et al. 2014). In einer kürzlich erschienenen Arbeit beobachtete man in Kardiomyozyten von NCLX-Knockout-Mäusen ein vermehrtes und früheres Anschwellen der Mitochondrien mit konsekutiver mPTP-Öffnung sowie eine verstärkte Bildung von Superoxid-Ionen als Zeichen der induzierten oxidativen Phosphorylierung und des oxidativen Stresses (Luongo et al. 2017). In NCLX-Knockout B-Lymphozyten wurden vermehrt apoptotische Zellen und depolarisierte Mitochondrien als früherer Marker der Apoptose nachgewiesen (Kim et al. 2012). Ergänzend dazu stehen Ergebnisse, die eine erhöhte NCLX-Aktivität mit einem verbesserten Zellüberleben in Verbindung bringen. Beispielsweise zeigte die Überexpression des NCLX in Kardiomyozyten eine gesteigerte mitochondriale Calciumelimination, die mit reduzierter Calciumakkumulation in Mitochondrien und einer verminderten ROS-Produktion einhergeht. Die Calciumschwelle zur Induktion mitochondrialer Apoptosesignale wurde verringert, sodass die Öffnung des mPTP erst bei höheren Calciumkonzentrationen initiiert wird. Diese 2007 erschienene Arbeit impliziert, dass die Verstärkung der NCLX-Funktion eine große Bedeutung in der Therapie von Erkrankungen einnimmt, bei denen die Calciumdysregulation eine große Bedeutung spielt (Luongo et al. 2017). Ferner wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Proteinkinase A die mitochondriale Fragmentierung reduziert (Dagda et al. 2011), die Bildung von mitochondrialen Netzwerken fördert und neuroprotektive Wirkung ausübt (Merrill et al. 2011). Eine Erhöhung der PINK1-Expression verbessert die basale und Staurosporin-induzierte Apoptose (Petit et al. 2005). Eine Verbindung zwischen PINK1, NCLX und ALS wird durch eine Studie unterstützt, die in Muskelzellen von ALS-Patienten sowie hSOD1G93A-Mäusen eine verminderte Expression von PINK1 mRNA feststellte (Knippenberg et al. 2013). Einerseits implizieren diese Studien eine Verschlechterung des Zellüberlebens durch Hemmung der NCLX, während eine Erhöhung der NCLX-Aktivität sich positiv auf diese ausübt. Auf der anderen Seite sprechen weitere Forschungsergebnisse für ein verbessertes Zellüberleben durch die Behandlung mit CGP37157, einem Inhibitor der NCLX-Aktivität in ALS (Lautenschlager et al. 2013) und anderen neurodegenerativen Erkrankungen (Martinez-Sanz et al. 2015).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen weder einen positiven Effekt durch Forskolin noch einen negativen oder positiven Effekt von CGP37157 auf das Zellüberleben spinaler Neurone. Die Betrachtung der prozentualen Verteilung

überlebter Neurone nach Forskolin-Behandlung zeigte einen höheren Anteil an gesunden MN im Vergleich zu gesunden Nicht-MN. Dies indiziert ein MN-spezifisches Ansprechen auf Forskolin. Schlussfolgernd konnte weder eine Aktivierung des NCLX noch eine Hemmung seiner Funktion einen positiven Effekt auf das neuronale Überleben unter normalen Bedingungen, d.h. außerhalb eines exzitotoxischen Milieus, ausüben. Toxische Effekte der NCLX-Modulatoren wurden nicht nachgewiesen.

Um die Auswirkungen der NCLX-Modulation auf das Zellüberleben unter exzitotoxischen Bedingungen, wie sie in ALS vorliegen, zu untersuchen, wurde eine kombinierte Behandlung von Forskolin oder CGP37157 mit Kainat vorgenommen. Eine selektive Vulnerabilität der MN gegenüber Kainat-induzierter Exzitotoxizität wurde in einer Studie von Lautenschläger *et al.* nachgewiesen, wobei gesunde und hSOD1G93A MN ein verringertes Überleben nach Behandlung mit Kainat aufwiesen (Lautenschlager *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kainat-induzierte Exzitotoxizität, die zu verstärktem Zelluntergang führt, bestätigt werden. Eine selektive Vulnerabilität der MN zeigte sich durch den signifikant verringerten prozentualen Anteil an MN nach Kainat-Behandlung. Die Hypothese eines verbesserten Zellüberlebens durch Forskolin vermittelte NCLX-Aktivierung unter exzitotoxischen Bedingungen konnte jedoch nicht belegt werden. Für eine kombinierte Behandlung von Kainat mit CGP37157 als NCLX-Inhibitor wurde bereits ein positiver Effekt auf das absolute neuronale Überleben beschrieben (Lautenschlager *et al.* 2013). Eine weitere Studie zeigte einen positiven Effekt von CGP37157 in chromaffinen Zellen, wobei Veratridin als Zellstressor genutzt wurde. In diesen Experimenten konnte unter CGP37157 eine verminderte ROS-Produktion, mitochondriale Depolarisation und Cytochrom C-Freisetzung beobachtet werden (Nicolau *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte ein höherer prozentualer Anteil an MN nach Kainat und CGP37157 Co-Inkubation in der Kontrollgruppe im Vergleich zur alleinigen Kainat-Exposition festgestellt werden. Eine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens nach kombinierter Behandlung in hSOD1G93A MN wurde nicht gemessen.

Insgesamt zeigte sich kein positiver Effekt durch die Aktivierung oder Inhibition der NCLX-Aktivität auf das neuronale Überleben, weder unter basalen noch unter exzitotoxischen Bedingungen. Die Diskrepanz zu anderen Studien, die CGP37157 verwendeten, kann wiederum durch die geringere Zellzahl begründet werden. Der fehlende Einfluss von Forskolin auf das Zellüberleben steht im Einklang mit den

Ergebnissen aus der Messung der intrazellulären Calciumkonzentration, die unter Zellaktivierung keine Änderungen in der Calciumdynamik feststellte. Bei der Induktion der Neurodegeneration spielen viele Faktoren eine Rolle, sodass eine Behandlung mit Forskolin möglicherweise erst in Kombination mit weiteren positiven Modulatoren eine ausreichende Kompensation der Kainat-induzierten Calciumüberladung erreicht. Vorangegangene Studien arbeiteten zudem mit nicht-motoneuronalen Zelllinien, sodass diese abweichenden Ergebnisse ein Ausdruck der MN-spezifischen Regulationsmechanismen sein können.

### **6.3 In welchem Ausmaß ist die Expression des NCLX-Transporters an den Mitochondrien durch die ALS gestört bzw. verändert?**

Nach den funktionellen Aspekten wurden schließlich die NCLX-Lokalisation sowie die NCLX-Expression unter basalen Bedingungen und nach Forskolin- bzw. CGP3757-Behandlung im hSOD1G93A-Modell näher untersucht. Die Lokalisation des NCLX in der inneren mitochondrialen Membran wurde bereits in diversen nicht-neuronalen Zelllinien nachgewiesen, darunter beispielsweise SH-SY5Y-Zellen (Palty et al. 2010), Kardiomyozyten (Takeuchi et al. 2013) und B-Lymphozyten (Kim et al. 2012). Eine weitere Studie zeigte zudem eine deutliche Expression in der Plasmamembran (Cai und Lytton 2004). In den immunhistochemischen Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigten eine Expression des NCLX in den Zellsomata und den Zellfortsätzen sowie ein reduziertes Signal im Nucleus. Dies ist vereinbar mit einer mitochondrialen Lokalisation des NCLX in MN. Die Untersuchung der NCLX-Expression mittels Western Blot ergab eine deutliche Proteinbande bei etwa 60 kDa und eine schwächere bei etwa 100 kDa. Dieses Ergebnis steht mit der aktuellen Literatur im Einklang. So wurde 1992 erstmals eine 110 kDa-Isoform eines mitochondrialen Natrium-Calcium-Transporters nachgewiesen (Li et al. 1992). In Endothelzellen der Ratte detektierte die Arbeitsgruppe um Zu *et al.* eine schwache 50 kDa-Bande und eine stärkere 100 kDa-Bande (Zu et al. 2015). Palty *et al.* zeigte drei NCLX-Isoformen mit einer Proteinelänge von 50 kDa, 70 kDa und 100 kDa, wobei letztere ein Dimer darstellt (Palty et al. 2004). Die fehlende Detektion der 70 kDa-Bande kann in der Verwendung verschiedener Untersuchungsmaterialien begründet sein. Palty *et al.* nutzte Zellysate und isolierte Mitochondrien aus dem Gehirn der Maus und HEK293-Zellen, während hier die

NSC34-Zelllinie verwendet wurde, die ein spezifischeres Modell für spinale MN darstellt.

Die immunhistochemische Quantifizierung des NCLX in der primären MN Co-Kultur ergab keine signifikanten Unterschiede in der NCLX-Expression zwischen ALS-Modell und Kontrolle. Dies stimmt mit der Arbeit um Mühling *et al.* von 2014 überein, bei der eine mRNA-Quantifizierung verschiedener Calciumtransporter im N. hypoglossus vorgenommen wurde. Es konnte bei hSOD1G93A Neuronen keine Veränderung der NCLX mRNA-Expression nachgewiesen werden (Muhling et al. 2014). Bei der Expressionsanalyse in den NSC34-Zellen mittels Western Blot-Verfahren wurde hingegen eine hochsignifikante Reduktion der NCLX-Expression im ALS-Modell unter nativen Bedingungen gemessen, was die Hypothese einer verminderten NCLX-Expression als Ursache für die mitochondriale Calciumüberladung unterstützt. Möglicherweise liegt der Diskrepanz der immunhistochemischen und Western Blot-Ergebnisse ein Umverteilungsphänomen zugrunde. Die immunhistochemische Quantifizierung könnte Proteinmengen detektieren, die sich zur Proteindegradation in Proteasomen oder Autophagosomen befinden. Dadurch ergibt sich eine unverändert hohe NCLX-Expression in hSOD1G93A MN. Bei der Lyse von Zellen zur Quantifizierung mittels Western Blot-Methode werden Proteasomkomplexe und membrangebundene Proteine zum Teil abgetrennt und entziehen sich der Detektion.

Neben den basalen Bedingungen wurde eine Quantifizierung der NCLX-Expression nach Forskolin- und CGP37157-Behandlung vorgenommen. Eine Behandlung mit dem NCLX-Aktivator Forskolin erhöhte das in hSOD1G93A NSC34-Zellen verminderte Expressionsniveau beider NCLX-Isoformen deutlich. Das Normallevel, definiert als NCLX-Expression in hSOD1WT NSC34-Zellen unter unbehandelten Bedingungen, wurde nicht erreicht. Allerdings konnte auch nach einer Behandlung mit CGP37157, einem Inhibitor des NCLX, eine gesteigerte NCLX-Expression der 60 kDa-Isoform in hSOD1G93A NSC34-Zellen quantifiziert werden. In der Kontrollgruppe ließ sich nach Forskolin- oder CGP37157-Behandlung keine Veränderung der NCLX-Expression beider Isoformen nachweisen. Der Unterschied zwischen der gesunden und hSOD1G93A-Gruppe impliziert eine gestörte NCLX-Regulation in ALS, die für die gestörte Calciumelimination aus Mitochondrien verantwortlich sein kann.

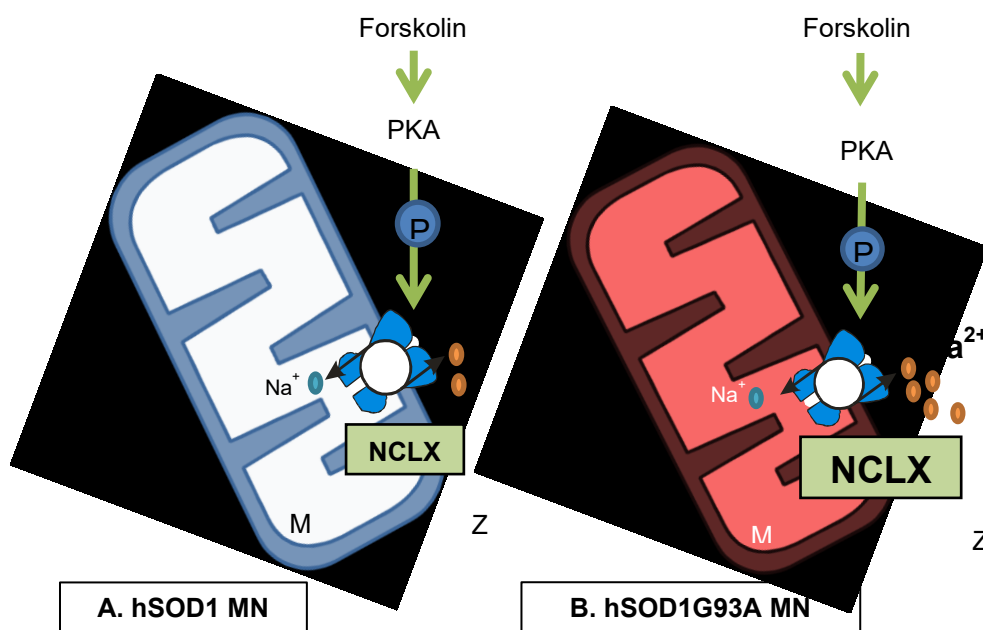
Zusammenfassend erscheint das Expressionsmuster des NCLX bei der ALS in dieser Arbeit kontrovers. Nimmt man Umverteilungsphänomene und die Detektion von

Abbauprodukten durch die immunhistochemische Analyse an, so lässt sich der fehlende Unterschied zwischen der NCLX-Expression im ALS-Modell im Vergleich zur Kontrolle in der immunhistochemischen Quantifizierung erklären. In diesem Fall ist von einer Erniedrigung der NCLX-Expression auszugehen. Dies würde die mitochondriale Calciumüberladung durch ineffektive Elimination aus der Matrix begründen, die eine mitochondriale Dysfunktion mit sich zieht. Forskolin als indirekten Aktivator des NCLX, der über eine Induktion der Proteinkinase A wirkt, war in der Lage, die NCLX-Expression deutlich anzuheben und könnte somit der mitochondrialen Calciumüberladung entgegenwirken.



## 7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise für eine Beteiligung des NCLX in der Pathogenese der ALS, was in Abbildung 19 im Überblick dargestellt ist. So wurden Unterschiede bei der akuten Reaktion auf Forskolin zwischen kranken und gesunden MN nachgewiesen, die eine Bedeutung des NCLX bei der Störung der mitochondrialen Calciumelimination implizieren. Simultane Messungen der Calciumkonzentration in unterschiedlichen Zellkompartimenten unter Forskolin-Applikation sollten in zukünftigen Studien durchgeführt werden, um den weiteren



**Abbildung 19:** Einfluss von Forskolin auf die NCLX-Expression und –Aktivität. Der Natrium-Calcium-Lithium-Transporters (NCLX) ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und ist maßgeblich für die Elimination des Calciums ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus der Matrix im Austausch gegen Natrium ( $\text{Na}^+$ ) verantwortlich. Forskolin ist ein Aktivator der Proteinkinase A (PKA), welches durch Phosphorylierung (P) die Aktivität des NCLX erhöht. A. Forskolin bewirkte in gesunden Motoneuronen (hSOD1 MN) keine Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration und keine Änderung der Expression des mitochondrialen NCLX. B. In MN mit hSOD1G93A-Mutation (hSOD1G93A MN) konnte nach Forskolin-Applikation ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sowie eine erhöhte Expression des NCLX-Transporters nachgewiesen. (M, Matrix; Z, Zytoplasma)

Weg des aus Mitochondrien eliminierten Calciums zu untersuchen. Weiterführende Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration können Aufschluss darüber geben, ob unter kombinierter Modulation des NCLX und weiterer Calciumregulatoren des ERMCC die in hSOD1G93A MN nachgewiesene Verminderung der Calciumelimination nach Zellaktivierung aufgehoben werden kann. Ein Beispiel wäre die Applikation von Forskolin und einem SERCA-Aktivator, sodass eine Rückführung

des Calciums in ER-Speicher beschleunigt wird. Eine kombinierte Behandlung von Modulatoren des ERMCC kann ferner auf das Überlebensassay angewendet werden, da durch Forskolin oder CGP37157 allein keine Verbesserung des Zellüberlebens unter exzitotoxischen Bedingungen hervorgerufen wurden. Für aussagekräftigere, funktionelle Untersuchungen ist auch die Entwicklung spezifischerer Modulationsmöglichkeiten ausschlaggebend, die direkt und ausschließlich am NCLX wirken sollten. Eine eindeutige Aussage über das Expressionslevel des NCLX in ALS konnten die durchgeführten Experimente nicht treffen. Ein wichtiger Faktor in folgenden Studien ist daher die Evaluation der NCLX-Expression. Ferner könnten Untersuchungen zu möglichen Mutationen des NCLX-Gens und Expressionsanalysen seiner Aktivatoren und Inhibitoren folgen, die zusammen mit einer differenzierten Quantifizierung und Lokalisation der NCLX-Isoformen in MN Aufschluss über die Rolle des NCLX in ALS geben werden. Dazu ist die Entwicklung spezifischerer Antikörper nötig, die eine Differenzierung der Isoformen erlaubt.

Der progressive Untergang der MN in der Pathogenese der ALS kann bisher nicht aufgehalten werden und verkürzt das Leben der PatientenInnen erheblich. Die Therapie beschränkt sich auf symptomatische Konzepte und das für ALS einzig zugelassene Medikament kann das Überleben um nur 6 Monate verlängern. Aus diesen Gründen ist ein detaillierteres Verständnis der pathogenetischen Prozesse wichtig, um neue suffiziente Angriffspunkte pharmakologischer Therapiekonzepte zu identifizieren. In dieser Arbeit wird erstmals im Rahmen der ALS-Forschung der Blick auf den mitochondrialen Natrium-Calcium-Lithium-Transporter gerichtet, der für die Calciumelimination aus Mitochondrien eine herausragende Bedeutung hat. Dabei konnten Hinweise für die Beteiligung des NCLX bei der Pathogenese der ALS nachgewiesen werden, die es nach diesem ersten Schritt weiter zu verifizieren gilt. Forskolin zeigte insbesondere durch den positiven Effekt auf die Erhöhung der NCLX-Expression, was der Calciumüberladung in Mitochondrien entgegenwirkt, protektives Potenzial. Folgende Studien sind nötig, um die Rolle des NCLX bei der Calciumdysregulation hinreichend aufklären und seine Bedeutung als therapeutischen Angriffspunkt konstruktiv bewerten zu können.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adam-Vizi V, Starkov AA. 2010. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2:S413-426.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, Labella V, Smith RG, Appel SH. 1994. The Role of Calcium-Binding Proteins in Selective Motoneuron Vulnerability in Amyotrophic-Lateral-Sclerosis. *Annals of Neurology*, 36 (6):846-858.
- Battistini S, Giannini F, Greco G, Bibbo G, Ferrera L, Marini V, Causarano R, Casula M, Lando G, Patrosso MC, Caponnetto C, Origone P, Marocchi A, Del Corona A, Siciliano G, Carrera P, Mascia V, Giagheddu M, Carcassi C, Orru S, Garre C, Penco S. 2005. SOD1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis. Results from a multicenter Italian study. *J Neurol*, 252 (7):782-788.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476 (7360):341-345.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*, 330 (9):585-591.
- Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32 (5-6):235-249.
- Bilsland LG, Nirmalanathan N, Yip J, Greensmith L, Duchen MR. 2008. Expression of mutant SOD1 in astrocytes induces functional deficits in motoneuron mitochondria. *J Neurochem*, 107 (5):1271-1283.
- Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5 (12):1051-1061.
- Boyman L, Williams GS, Khananshvil D, Sekler I, Lederer WJ. 2013. NCLX: the mitochondrial sodium calcium exchanger. *J Mol Cell Cardiol*, 59:205-213.
- Brown D, Lydon J, McLaughlin M, Stuart-Tilley A, Tyszkowski R, Alper S. 1996. Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol*, 105 (4):261-267.
- Burgess A, Vigneron S, Brioudes E, Labbe JC, Lorca T, Castro A. 2010. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (28):12564-12569.
- Cai X, Lytton J. 2004. Molecular cloning of a sixth member of the K<sup>+</sup>-dependent Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger gene family, NCKX6. *J Biol Chem*, 279 (7):5867-5876.
- Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. 1996. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci*, 16 (13):4069-4079.
- Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH. 2000. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*, 20 (1):240-250.
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. 1992. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn*, 194 (3):209-221.
- Castaldo P, Cataldi M, Magi S, Lariccia V, Arcangeli S, Amoroso S. 2009. Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Prog Neurobiol*, 87 (1):58-79.

- Choi DW. 1985. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*, 58 (3):293-297.
- Corona JC, Tapia R. 2007. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology*, 52 (5):1219-1228.
- Cox DA, Conforti L, Sperelakis N, Matlib MA. 1993. Selectivity of inhibition of Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP-37157. *J Cardiovasc Pharmacol*, 21 (4):595-599.
- Cozzolino M, Carri MT. 2012. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, 97 (2):54-66.
- Da Cruz S, De Marchi U, Frieden M, Parone PA, Martinou JC, Demaurex N. 2010. SLP-2 negatively modulates mitochondrial sodium-calcium exchange. *Cell Calcium*, 47 (1):11-18.
- Dagda RK, Gusdon AM, Pien I, Strack S, Green S, Li C, Van Houten B, Cherra SJ, 3rd, Chu CT. 2011. Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ*, 18 (12):1914-1923.
- David G, Talbot J, Barrett EF. 2003. Quantitative estimate of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in stimulated motor nerve terminals. *Cell Calcium*, 33 (3):197-206.
- De Marchi U, Santo-Domingo J, Castelbou C, Sekler I, Wiederkehr A, Demaurex N. 2014. NCLX protein, but not LETM1, mediates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> extrusion, thereby limiting Ca<sup>2+</sup>-induced NAD(P)H production and modulating matrix redox state. *J Biol Chem*, 289 (29):20377-20385.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72 (2):245-256.
- Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. 2012. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (32):12986-12991.
- Duchen MR. 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflugers Arch*, 464 (1):111-121.
- Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT. 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (37):13860-13865.
- Finsterer J, Burgunder JM. 2014. Recent progress in the genetics of motor neuron disease. *Eur J Med Genet*, 57 (2-3):103-112.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, Duchen MR, Abramov AY. 2009. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell*, 33 (5):627-638.
- Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, Pozzan T. 2010. Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Cell*, 38 (2):280-290.
- Gleichmann M, Mattson MP. 2011. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid Redox Signal*, 14 (7):1261-1273.

- Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU. 2010. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 47 (2):165-174.
- Grosskreutz J, Haastert K, Dewil M, Van Damme P, Callewaert G, Robberecht W, Dengler R, Van Den Bosch L. 2007. Role of mitochondria in kainate-induced fast Ca<sup>2+</sup> transients in cultured spinal motor neurons. *Cell Calcium*, 42 (1):59-69.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260 (6):3440-3450.
- Gurney ME. 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 331 (25):1721-1722.
- Haastert K, Grosskreutz J, Jaeckel M, Laderer C, Bufler J, Grothe C, Claus P. 2005. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells--a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J Neurosci Methods*, 142 (2):275-284.
- Ishii K, Hirose K, Iino M. 2006. Ca<sup>2+</sup> shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO Rep*, 7 (4):390-396.
- Jiang D, Zhao L, Clapham DE. 2009. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science*, 326 (5949):144-147.
- Joshi DC, Tewari BP, Singh M, Joshi PG, Joshi NB. 2015. AMPA receptor activation causes preferential mitochondrial Ca(2+)(+) load and oxidative stress in motor neurons. *Brain Res*, 1616:1-9.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 40 (5):572-574.
- Kawamata H, Manfredi G. 2010. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev*, 131 (7-8):517-526.
- Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. 2012. Pivotal role of mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in antigen receptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in DT40 and A20 B lymphocytes. *Journal of Physiology-London*, 590 (3):459-474.
- Knippenberg S, Sipos J, Thau-Habermann N, Korner S, Rath KJ, Dengler R, Petri S. 2013. Altered expression of DJ-1 and PINK1 in sporadic ALS and in the SOD1(G93A) ALS mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72 (11):1052-1061.
- Kostic M, Ludtmann MH, Bading H, Hershfinkel M, Steer E, Chu CT, Abramov AY, Sekler I. 2015. PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting Survival of PINK1-Deficient Dopaminergic Neurons. *Cell Rep*, 13 (2):376-386.
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323 (5918):1205-1208.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. 1996. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet*, 347 (9013):1425-1431.
- Lautenschlager J, Prell T, Ruhmer J, Weidemann L, Witte OW, Grosskreutz J. 2013. Overexpression of human mutated G93A SOD1 changes dynamics of the ER

- mitochondria calcium cycle specifically in mouse embryonic motor neurons. *Exp Neurol*, 247:91-100.
- Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A. 1990. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 17 (2):118-132.
- Li W, Shariat-Madar Z, Powers M, Sun X, Lane RD, Garlid KD. 1992. Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from beef heart mitochondria. *J Biol Chem*, 267 (25):17983-17989.
- Luongo TS, Lambert JP, Gross P, Nwokedi M, Lombardi AA, Shanmughapriya S, Carpenter AC, Kolmetzky D, Gao E, van Berlo JH, Tsai EJ, Molkentin JD, Chen X, Madesh M, Houser SR, Elrod JW. 2017. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature*, 545 (7652):93-97.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopfer EG, Waite A, Rollinson S, Chio A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pampillet R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. 2012. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*, 11 (4):323-330.
- Martinez-Sanz FJ, Lajarin-Cuesta R, Moreno-Ortega AJ, Gonzalez-Lafuente L, Fernandez-Morales JC, Lopez-Arribas R, Cano-Abad MF, de los Rios C. 2015. Benzothiazepine CGP37157 Analogues Exert Cytoprotection in Various in Vitro Models of Neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci*, 6 (9):1626-1636.
- McCormack JG, Denton RM. 1990. Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. *Proc Nutr Soc*, 49 (1):57-75.
- Merrill RA, Dagda RK, Dickey AS, Cribbs JT, Green SH, Usachev YM, Strack S. 2011. Mechanism of neuroprotective mitochondrial remodeling by PKA/AKAP1. *PLoS Biol*, 9 (4):e1000612.
- Montero M, Alonso MT, Albillos A, Garcia-Sancho J, Alvarez J. 2001. Mitochondrial Ca(2+)-induced Ca(2+) release mediated by the Ca(2+) uniporter. *Mol Biol Cell*, 12 (1):63-71.
- Muhling T, Duda J, Weishaupt JH, Ludolph AC, Liss B. 2014. Elevated mRNA-levels of distinct mitochondrial and plasma membrane Ca(2+) transporters in individual hypoglossal motor neurons of endstage SOD1 transgenic mice. *Front Cell Neurosci*, 8:353.
- Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. 2009. Controlling metabolism and cell death: at the heart of mitochondrial calcium signalling. *J Mol Cell Cardiol*, 46 (6):781-788.
- Netzahualcoyotzi C, Tapia R. 2015. Degeneration of spinal motor neurons by chronic AMPA-induced excitotoxicity in vivo and protection by energy substrates. *Acta Neuropathol Commun*, 3:27.
- Nguyen KT, Garcia-Chacon LE, Barrett JN, Barrett EF, David G. 2009. The Psi(m) depolarization that accompanies mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake is greater in mutant

- SOD1 than in wild-type mouse motor terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (6):2007-2011.
- Nicholls DG, Chalmers S. 2004. The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J Bioenerg Biomembr*, 36 (4):277-281.
- Nicolau SM, de Diego AM, Cortes L, Egea J, Gonzalez JC, Mosquera M, Lopez MG, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG. 2009. Mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *J Pharmacol Exp Ther*, 330 (3):844-854.
- Otsuguro K, Gautam SH, Ito S, Habara Y, Saito T. 2005. Characterization of forskolin-induced Ca<sup>2+</sup> signals in rat olfactory receptor neurons. *J Pharmacol Sci*, 97 (4):510-518.
- Palecek J, Lips MB, Keller BU. 1999. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol*, 520 Pt 2:485-502.
- Palty R, Sekler I. 2012. The mitochondrial Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger. *Cell Calcium*, 52 (1):9-15.
- Palty R, Ohana E, Hershinkel M, Volokita M, Elgazar V, Beharier O, Silverman WF, Argaman M, Sekler I. 2004. Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (24):25234-25240.
- Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D, Sekler I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (1):436-441.
- Parganlija D, Klinkenberg M, Dominguez-Bautista J, Hetzel M, Gispert S, Chimi MA, Droese S, Mai S, Brandt U, Auburger G, Jendrach M. 2014. Loss of PINK1 impairs stress-induced autophagy and cell survival. *PLoS One*, 9 (4):e95288.
- Parnis J, Montana V, Delgado-Martinez I, Matyash V, Parpura V, Kettenmann H, Sekler I, Nolte C. 2013. Mitochondrial exchanger NCLX plays a major role in the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, gliotransmission, and proliferation of astrocytes. *J Neurosci*, 33 (17):7206-7219.
- Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A. 2005. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem*, 280 (40):34025-34032.
- Prell T, Lautenschlager J, Grosskreutz J. 2013. Calcium-dependent protein folding in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium*, 54 (2):132-143.
- Rizzuto R, Brini M, Pozzan T. 1993. Intracellular targeting of the photoprotein aequorin: a new approach for measuring, in living cells, Ca<sup>2+</sup> concentrations in defined cellular compartments. *Cytotechnology*, 11 Suppl 1:S44-46.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362 (6415):59-62.
- Ruiz A, Alberdi E, Matute C. 2014. CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Death Dis*, 5:e1156.
- Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. 2013. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*, 136:2342-2358.
- Scorziello A, Savoia C, Sisalli MJ, Adornetto A, Secondo A, Boscia F, Esposito A, Polishchuk EV, Polishchuk RS, Molinaro P, Carlucci A, Lignitto L, Di Renzo G,

- Feliciello A, Annunziato L. 2013. NCX3 regulates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling through the AKAP121-anchored signaling complex and prevents hypoxia-induced neuronal death. *J Cell Sci*, 126 (Pt 24):5566-5577.
- Sharma V, Roy S, Sekler I, O'Halloran DM. 2017. The NCLX-type Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger NCX-9 Is Required for Patterning of Neural Circuits in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (13):5364-5377.
- Shaw PJ. 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76 (8):1046-1057.
- Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. 1996. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 39 (2):203-216.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, 276 (41):38084-38089.
- Szabadkai G, Duchen MR. 2008. Mitochondria: The hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Physiology*, 23 (2):84-94.
- Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S. 2013. The mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci Rep*, 3:2766.
- Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. 2002. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (52):50966-50972.
- Thayer SA, Miller RJ. 1990. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Physiol*, 425:85-115.
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. 1993. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci*, 13 (5):2085-2104.
- Van Damme P, Van Den Bosch L, Van Houtte E, Callewaert G, Robberecht W. 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity. *J Neurophysiol*, 88 (3):1279-1287.
- Vijayvergiya C, Beal MF, Buck J, Manfredi G. 2005. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci*, 25 (10):2463-2470.
- Vila L, Barrett EF, Barrett JN. 2003. Stimulation-induced mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] elevations in mouse motor terminals: comparison of wild-type with SOD1-G93A. *J Physiol*, 549 (Pt 3):719-728.
- Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. 2014. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends in Neurosciences*, 37 (8):433-442.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. 2005. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 31 (1-3):3-16.
- Werth JL, Thayer SA. 1994. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 14 (1):348-356.
- White RJ, Reynolds IJ. 1995. Mitochondria and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J Neurosci*, 15 (2):1318-1328.

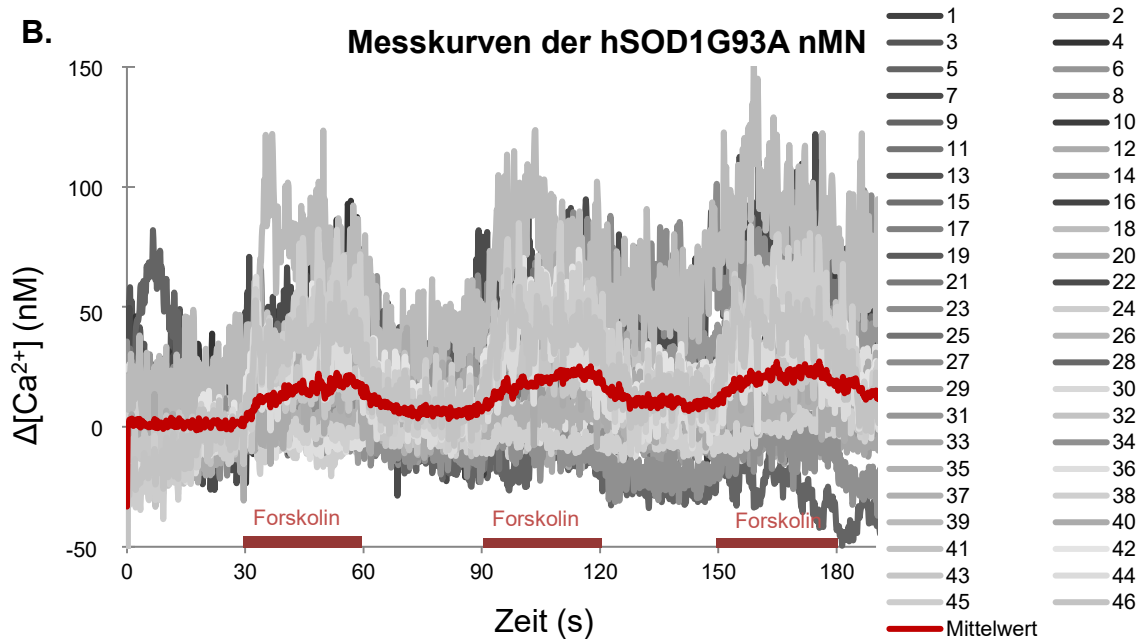
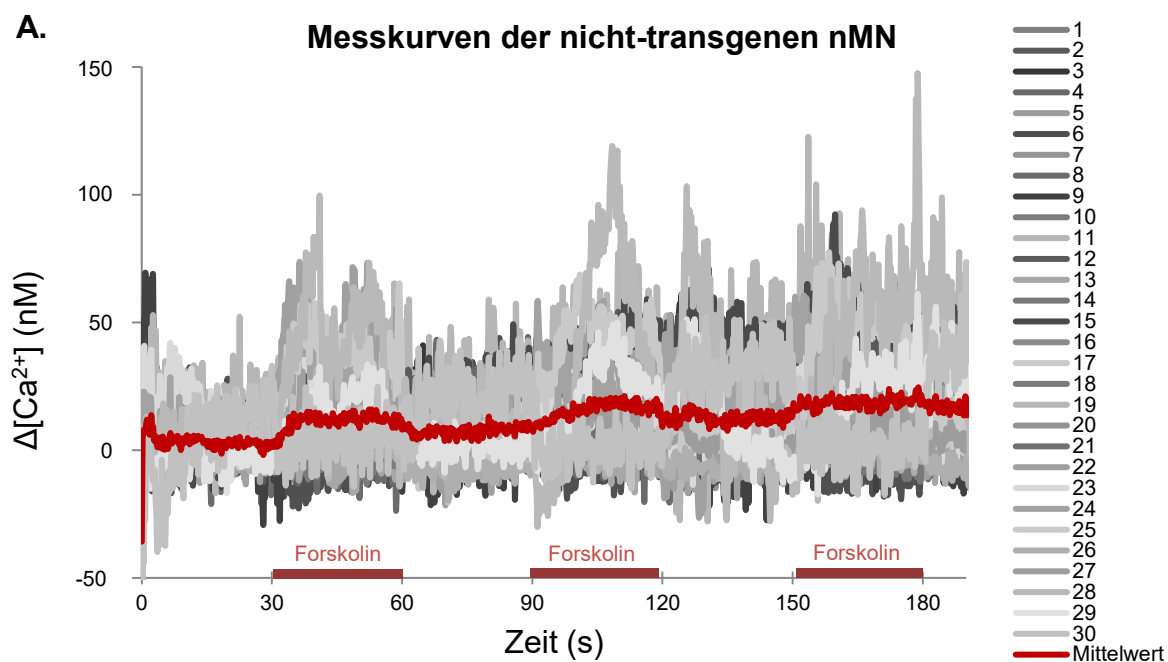


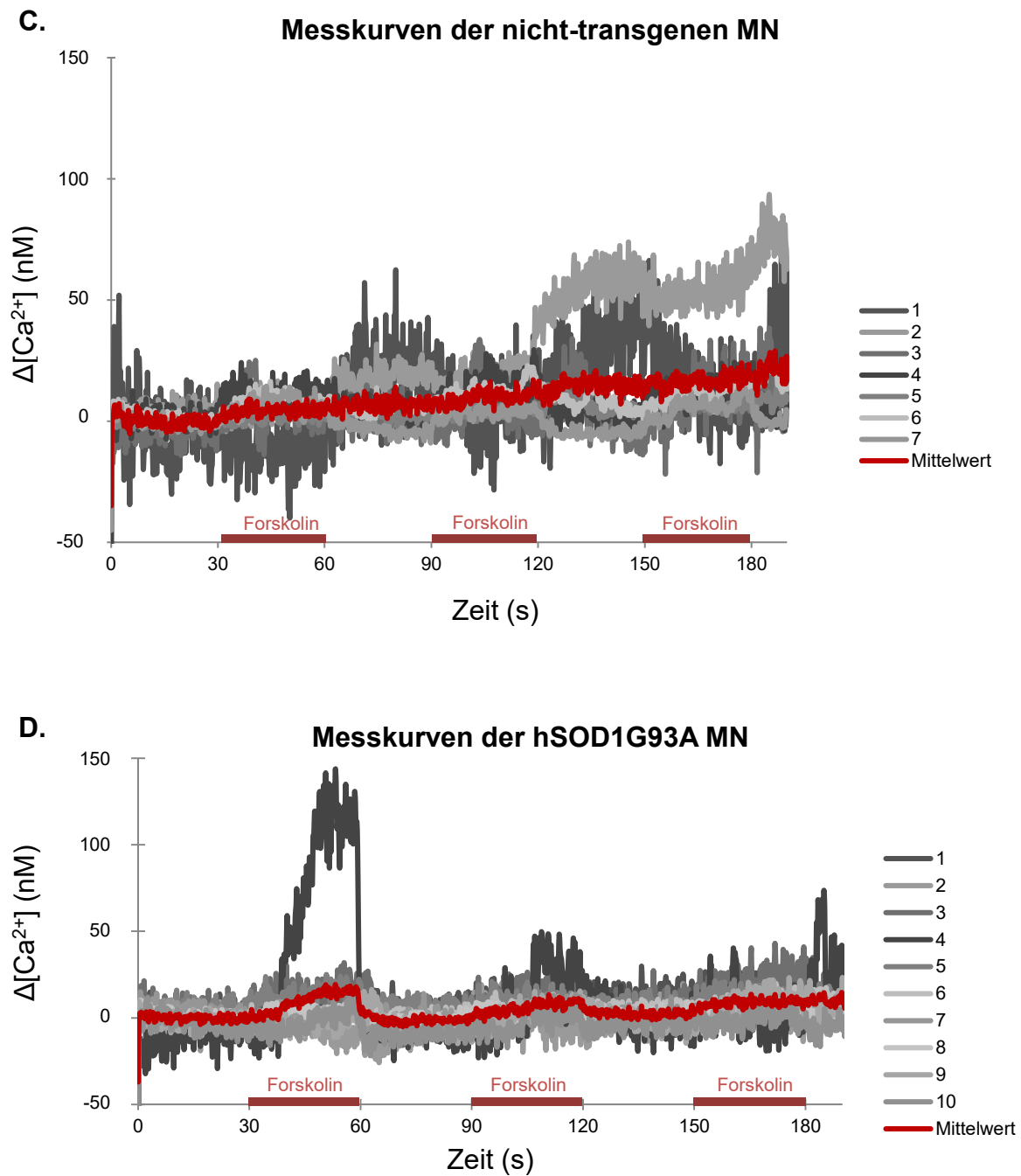
- Wood-Kaczmar A, Deas E, Wood NW, Abramov AY. 2013. The role of the mitochondrial NCX in the mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol*, 961:241-249.
- Yang F, He XP, Russell J, Lu B. 2003. Ca<sup>2+</sup> influx-independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and protein kinase C. *J Cell Biol*, 163 (3):511-523.
- Zu Y, Wan LJ, Cui SY, Gong YP, Li CL. 2015. The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger may reduce high glucose-induced oxidative stress and nucleotide-binding oligomerization domain receptor 3 inflammasome activation in endothelial cells. *Journal of Geriatric Cardiology*, 12 (3):270-278.

## 9 Anhang

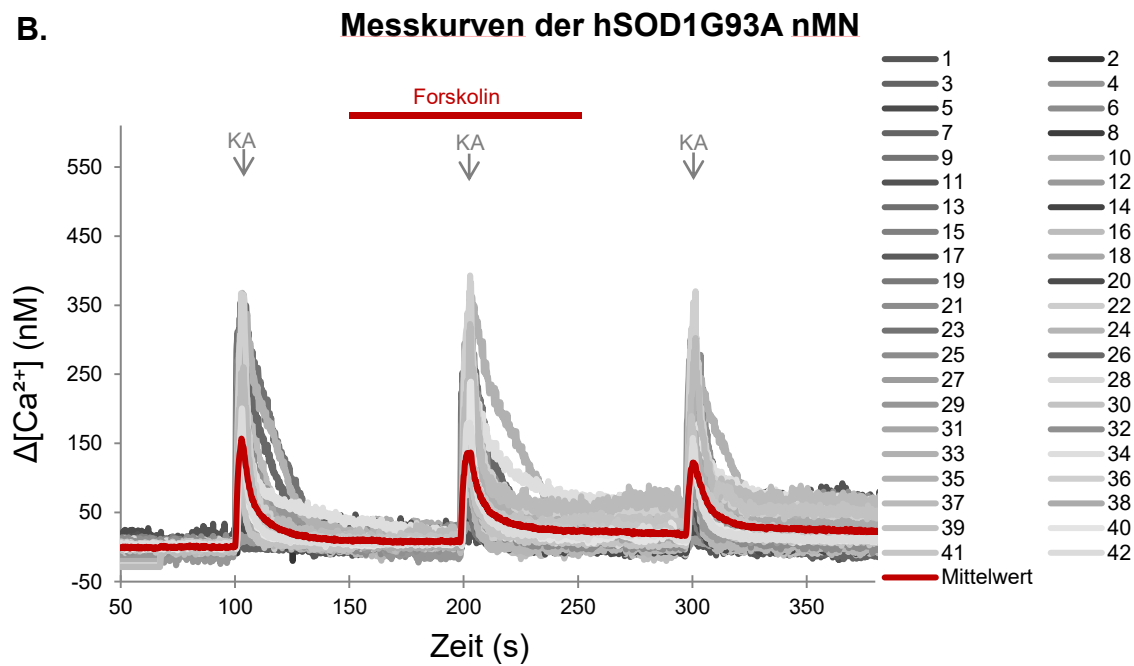
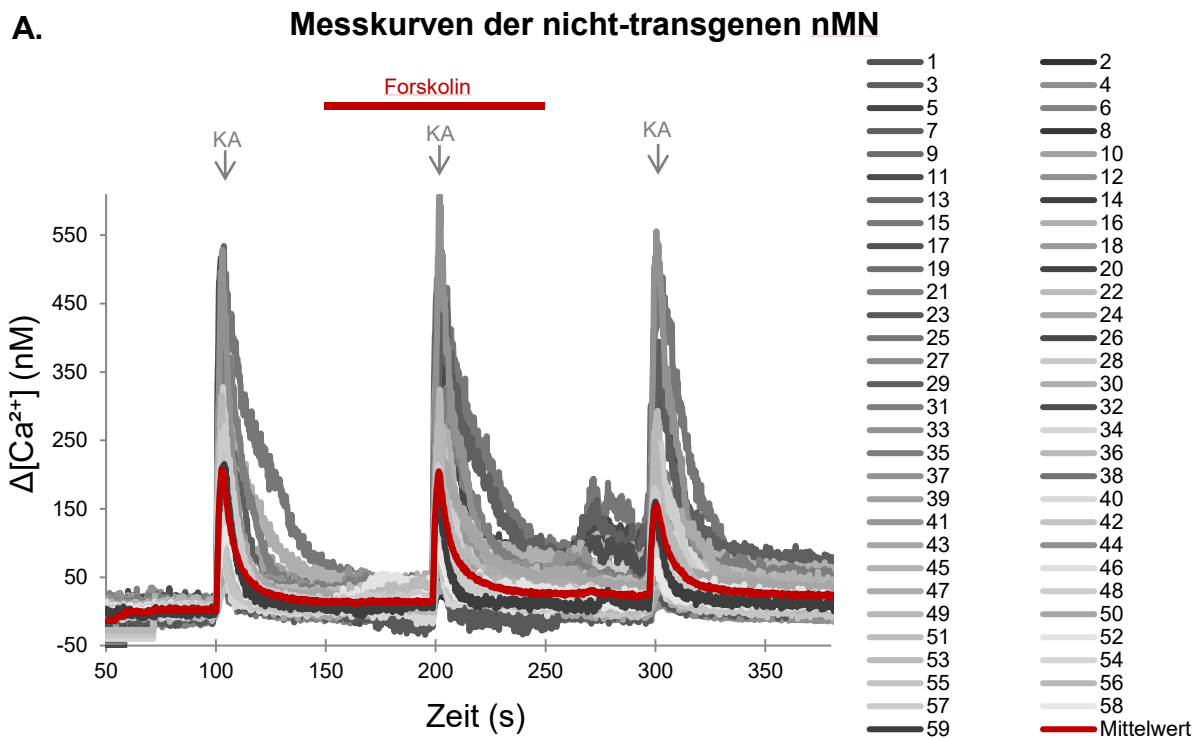
### 9.1 Ergänzende Abbildungen

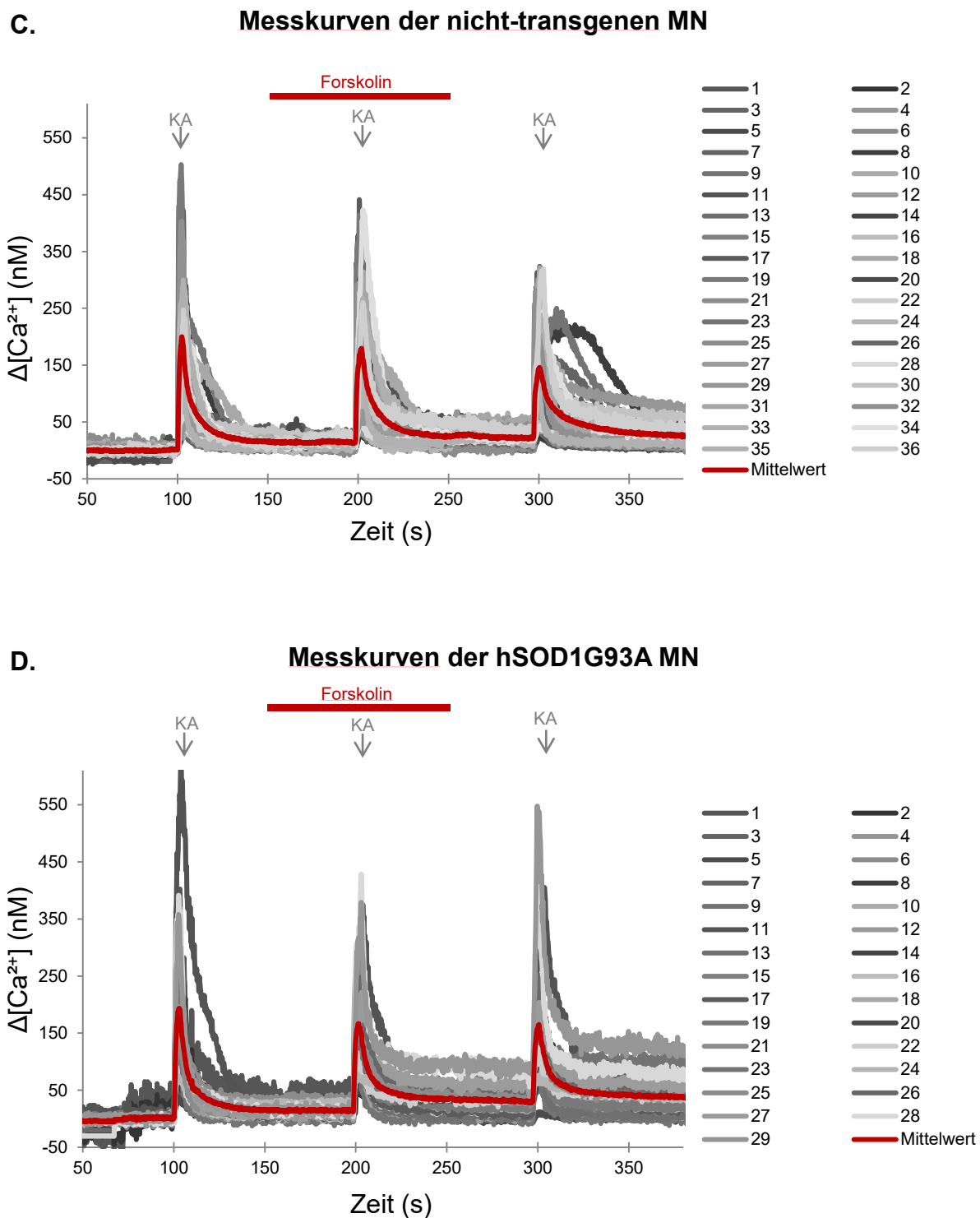
Im Folgenden sind ergänzend zu den Ergebnissen der Calcium-imaging-Experimente die Abbildungen 20 und 21 dargestellt, die die einzelnen Messkurven zeigen.





**Abbildung 20:** Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation. In 30 s Abständen wurde der Hintergrundlösung Forskolin zugesetzt (rote Balken). Die einzelnen Messkurven der **A.** nicht-transgenen nMN, **B.** hSOD1G93A nMN, **C.** nicht-transgenen MN und **D.** hSOD1G93A MN sind dargestellt.





**Abbildung 21:** Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation während einer Zellaktivierung.

Einzelne Messkurven der Nicht-Motoneurone (nMN) sind in A. und B. dargestellt. C. und D. zeigen die einzelnen Messkurven der Motoneurone (MN). Die Pfeile geben den Zeitpunkt einer 2 s-andauernden Kainat-Stimulation an. 50 s vor bis 50 s nach der zweiten Stimulation wurde Forskolin zugesetzt (roter Balken).

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Materialien und Geräte mit Herstellerangaben.....	17
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien mit Konzentrations- und Herstellerangaben ...	17
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung mit Herstellerangaben .....	19
<b>Tabelle 4:</b> Primer zur Genotypisierung der Mausembryonen mittels Polymerasekettenreaktion .....	23
<b>Tabelle 5:</b> Programm zur Genotypisierung von Mausembryonen mittels Polymerasekettenreaktion .....	23
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung des 10 %igen Polyacrylamid-Gels für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	27
<b>Tabelle 7:</b> Mittelwerte der Baseline vor Forskolin-Applikation in Nicht-Motoneuronen ( $\pm$ Standardabweichung).....	47
<b>Tabelle 8:</b> Mittelwerte der Calciummenge während einer Forskolin-Applikation in Nicht-Motoneuronen ( $\pm$ Standardabweichung) .....	48
<b>Tabelle 9:</b> Mittelwerte der Baseline vor Forskolin-Applikation in Motoneuronen ( $\pm$ Standardabweichung).....	49
<b>Tabelle 10:</b> Mittelwerte der Calciummenge während einer Forskolin-Applikation in Motoneuronen ( $\pm$ Standardabweichung).....	49
<b>Tabelle 11:</b> Mittelwerte der Calciummenge während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$ Standardabweichung)	53
<b>Tabelle 12:</b> Mittelwerte der maximalen Calciumkonzentration während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$ Standardabweichung).....	54
<b>Tabelle 13:</b> Mittelwerte der Zeitkonstante während einer Zellstimulation unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Forskolin ( $\pm$ Standardabweichung)	54
<b>Tabelle 14:</b> Mittelwerte der Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Kainat- Behandlung ( $\pm$ Standardabweichung).....	57
<b>Tabelle 15:</b> Mittelwerte der Zellzahlen und prozentualen Anteile nach NCXL- Modulation ( $\pm$ Standardabweichung) .....	60
<b>Tabelle 16:</b> Mittelwerte der Zellzahlen und prozentualen Anteile nach Kainat- und kombinierter Kainat-Behandlung ( $\pm$ Standardabweichung).....	63

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Multifaktorielle Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose. ....	3
<b>Abbildung 2:</b> Der ER-Mitochondrien-Calcium-Zyklus.....	8
<b>Abbildung 3:</b> Spektren der Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und unterschiedlicher Exzitation.....	33
<b>Abbildung 4:</b> Aufbau des Calcium imaging-Experimentes. ....	34
<b>Abbildung 5:</b> Applikationsprotokolle der Calcium imaging-Messungen in Motoneuron Ko-Kulturen. ....	36
<b>Abbildung 6:</b> Vergleich der relativen NCLX-Expression in hSOD1WT- und hSOD1G93A-NSC34-Zellen.....	40
<b>Abbildung 7:</b> Lokalisation und Proteinniveau des NCLX in primären Motoneuron Co-Kulturen. ....	41
<b>Abbildung 8:</b> Western Blot zur Quantifizierung des NCLX-Expressionslevels. ....	42
<b>Abbildung 9:</b> Relative NCLX-Expression der 60 kDa-Bande in der hSOD1-WT- und hSOD1G93A-Gruppe. ....	43
<b>Abbildung 10:</b> Relative 100 kDa NCLX-Expression in der hSOD1-WT- und hSOD1G93A-Gruppe. ....	45
<b>Abbildung 11:</b> Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation. ....	47
<b>Abbildung 12:</b> Baseline und AUC nach Forskolin-Applikation bei Nicht- Motoneuronen. ....	48
<b>Abbildung 13:</b> Baseline und AUC nach Forskolin-Applikation in Motoneuronen.....	50
<b>Abbildung 14:</b> Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin- Applikation während einer Zellaktivierung. ....	52
<b>Abbildung 15:</b> Einfluss von Forskolin auf die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Zellstimulation.....	55
<b>Abbildung 16:</b> Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Kainat-Exposition. .....	58
<b>Abbildung 17:</b> Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Forskolin- oder CGP37157-Exposition. ....	61
<b>Abbildung 18:</b> Absolute Zellzahlen und prozentuale Anteile nach Behandlung mit Kainat in Kombination mit Forskolin oder CGP37157. ....	64
<b>Abbildung 19:</b> Einfluss von Forskolin auf die NCLX-Expression und –Aktivität. ....	74

---

<b>Abbildung 20:</b> Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin-Applikation. ....	84
<b>Abbildung 21:</b> Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Forskolin- Applikation während einer Zellaktivierung. ....	86



## 9.4 Danksagung

Ein großer Dank gebührt PD Dr. Julian Großkreutz für die Vergabe dieses Promotionsthemas sowie seiner Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Erstellung der Arbeit. Ich schätze seine lehrreichen Ausführungen zur Thematik und Wissenschaft im weiteren Sinne. Auch bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit, an internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Otto Witte als Direktor der *Hans Berger Klinik für Neurologie* für seine Bestrebungen, den Zugang zur Forschung für MedizinstudentInnen zu fördern und PD Dr. Tino Prell für seine Unterstützung bei der Bewerbung um das IZKF-Stipendium. Dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung und dem Förderverein des Universitätsklinikum Jena e.V. danke ich für die Gewährung des Stipendiums.

Ich möchte Dr. Silke Keiner für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und deren Auswertung einen großen Dank aussprechen, die mir half, noch so schwierige Problemstellungen zu lösen. Dr. Beatrice Stubendorff verdient ein großes Dankeschön für ihre hervorragende koordinatorische Arbeit und ihren wertvollen Rat bei der Erstellung dieser Arbeit. Der gesamten Arbeitsgruppe *NEDIG* möchte ich herzlich danken. Ich durfte viel von euch lernen. Insbesondere danke ich Vedrana Tadic für ihre konstruktive Kritik, ihre Zeit und ihre Geduld bei den Calcium imaging-Experimenten; Saikata Sengupta, die sich stets bemühte, einen guten Rat für mich zu haben; Ayse Malci und Nadine Goldhammer für ihre Gesellschaft und Hilfe beim Experimentieren sowie Jingyu Liu, Adam Adam und allen anderen Kollegen im Forschungszentrum Lobeda für die interessanten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche, die nicht selten zur Regeneration der Motivation beitrugen. Auch den technischen Assistentinnen, besonders Svetlana Tausch, danke ich für die Durchführung der Maus-Präparationen und die gute Zusammenarbeit.

Danke an meine Kommilitonen, die meine Studienzeit so erlebnisreich und spannend gemacht haben und mich damit zur Promotion ermutigten. Insbesondere möchte ich Nelli meinen Dank aussprechen, die meine „Labor-Sorgen“ verstand und das Leid aber auch die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten mit mir teilte. Ich danke meinem Freund für seine aufbauenden Worte und sein Verständnis. Ein großes Dankeschön geht schließlich an meine Eltern und meine Schwester für ihr großes Vertrauen in meine Fähigkeiten und ihre mentale Unterstützung, ganz unabhängig vom Ergebnis. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen.



## 9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Julian Großkreutz, Dr. Silke Keiner und Dr. Beatrice Stubendorff.

Die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Thanh Tu Le