

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Alexander Storch

Themenvergebender Hochschullehrer: Prof. Dr. med. habil. Arndt Rolfs

Funktionelle Charakterisierung von zerebellären Purkinjezellen eines
Mausmodells des Morbus Niemann-Pick Typ C1

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Doctor rerum humanarum)

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Michael Jürgen Rabenstein, geb. am 07.08.1987 in Waldshut-Tiengen
aus Rostock

Rostock, 16.01.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0
International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Gutachter:

Prof. Dr. med. Arndt Rolfs, Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Nervenheilkunde

Prof. Dr. med. Björn Spittau, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

Prof. Dr. med. Thomas Gasser, Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Neurodegenerative Erkrankungen

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C	7
1.2 Funktionen und Eigenschaften des Kleinhirns.....	9
1.3 Beeinträchtigungen des Kleinhirns bei Morbus Niemann-Pick-Typ C und anderen Ataxien.....	16
1.4 Zielstellung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Haltung und Zucht von Mäusen	21
2.2 Bestimmung des Genotyps	21
2.3 Präparation akuter, parasagittaler Kleinhirnwurmschnitte	22
2.4 Elektrophysiologie.....	23
2.4.1 Allgemeine Konfiguration	23
2.4.2 Messung der Purkinjezellaktivitätsmuster	23
2.4.3 Spannungsrampenmessungen.....	25
2.4.4 Messung inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSC).....	25
2.5 Western Blot.....	26
2.5.1 Probenvorbereitung.....	26
2.5.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	27
2.5.3 Visualisierung und Quantifizierung der Proteinsignale.....	27
2.6 Immunfluoreszenz	28
2.7 Statistische Auswertung.....	28
2.8 Lösungen.....	29
2.9 Agonisten und Antagonisten der elektrophysiologischen Experimente	30
3 Ergebnisse.....	31

3.1	Purkinjezellen im Kleinhirn von NPC1 ^{-/-} -Mäusen degenerieren progressiv	31
3.2	Die Aktionspotentialmuster von Purkinjezellen verändern sich in Abhängigkeit der intrazellulären Chloridkonzentration.....	32
3.3	Die intrinsische Chloridleitfähigkeit von EAAT4 hat keinen Einfluss auf das Membranpotential von Purkinjezellen.....	39
3.4	Die Expression von Glutamattransportern im Kleinhirn von NPC1 ^{-/-} -Mäusen ist reduziert	42
3.5	Die GABAerge synaptische Transmission ist verändert in Purkinjezellen von NPC1 ^{-/-} -Mäusen.....	43
3.6	Die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluA2 ist hypophosphoryliert im Kleinhirn von NPC1 ^{-/-} -Mäusen.....	47
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
3.7.1	Untersuchungen zur Funktion und Expression der EAAT	50
3.7.2	Untersuchungen zur inhibitorischen synaptischen Transmission.....	51
3.7.3	Untersuchungen zu Expression und zum Phosphorylierungsstatus von GluA2 ..	51
4	Diskussion.....	52
4.1	Die intrinsische Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen ist chloridabhängig verändert in NPC1 ^{-/-} -Mäusen	53
4.2	Die Aktivität der EAAT beeinflusst die intrinsische Aktionspotentialgenerierung	55
4.3	Die reduzierte zerebelläre EAAT-Expression könnte zur Purkinjezelldegeneration in NPC1 ^{-/-} -Mäusen beitragen	59
4.4	Die GABAerge synaptische Transmission zu Purkinjezellen ist erhöht in NPC1 ^{-/-} -Mäusen.....	61
4.5	Die veränderte GABAerge Transmission in Purkinjezellen von NPC1 ^{-/-} -Mäusen könnte auf einer gestörten PKC-abhängigen AMPA-Rezeptortranslokation beruhen	63
4.6	Die PKC-Aktivität ist ein potentieller Marker zur Identifizierung und Charakterisierung therapeutisch wirksamer Substanzen.....	67
4.7	PKC-Modulatoren sind vielversprechende Therapieoption in NPC1 und anderen neurodegenerativen Erkrankungen.....	68

4.8	Mögliche Untersuchungen über die veränderte GluA2-Oberflächenexpression in Purkinjezellen von NPC1 ^{-/-} -Mäusen.....	70
4.9	Die gefundenen pathophysiologischen Veränderungen in NPC1 ^{-/-} -Mäusen könnten auf einer Dysfunktion von Mitochondrien beruhen	72
4.10	Fazit	75
5	Literaturverzeichnis.....	77
6	Abkürzungsverzeichnis	95
7	Tabellenverzeichnis.....	97
8	Abbildungsverzeichnis	98
9	Anhänge.....	99
9.1	Verwendete Antikörper, PCR-Primer, Materialien, Chemikalien, Geräte und Software	99
9.2	Pullerprogramm und Umkehrpotentiale	103
9.3	Übersicht der Ergebnisse	103
10	Danksagung.....	106

Zusammenfassung

Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) ist eine seltene lysosomale Speichererkrankung zu dessen klinischem Bild auch das neurologische Symptom der zerebellären Ataxie zählt. Die zerebelläre Ataxie beruht auf dem Verlust der zerebellären Purkinjezellen, wobei die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen bisher nicht aufgeklärt wurden.

In anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. den spinocerebellären Ataxien (spinocerebellar ataxia, SCA), wurde gezeigt, dass Störungen der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen und reduzierte zerebelläre Expression der Glutamattransporter excitatory amino acid transporters (EAAT) zur Dysfunktion und Degeneration von Purkinjezellen beitragen. Basierend darauf wurde untersucht ob in NPC1 ebenfalls Störungen der Purkinjezellaktivität und der EAAT-Expression vorliegen und zur Pathophysiologie beitragen. Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob neben der bekannten gestörten exzitatorischen synaptischen Transmission zu Purkinjezellen, auch die inhibitorische Transmission in NPC1 verändert ist.

Für die Untersuchungen wurde elektrophysiologisch die Purkinjezellaktivität, sowie die inhibitorische synaptische Transmission zu diesen, in NPC1-defizienten Mäusen und Kontrollen charakterisiert. Zudem wurden die EAAT-Expression und die Purkinjezelldegeneration mithilfe von Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt.

Die Detektion des Purkinjezellmarkers Calbindin D28K in Immunfluoreszenzfärbungen und im Western Blot bestätigte, dass in NPC1-defizienten Mäusen Purkinjezellen degenerieren. Funktionell konnten in Purkinjezellen drei Muster von intrinsischer Aktionspotentialgenerierung gemessen werden: tonisch aktiv, in Bursts aktiv und inaktiv. Dabei wurden keine Unterschiede in der Verteilung der Feuermuster zwischen NPC1-defizienten und Kontrollmäusen gefunden.

Um den Einfluss der EAAT auf die Aktivität der Purkinjezellen zu untersuchen, wurde deren Eigenschaft herangezogen, dass diese nicht nur als Glutamattransporter, sondern auch als Ionenkanal für Chlorid fungieren. Bei hoher intrazellulärer Chloridkonzentration waren Unterschiede in der Aktivitätsmustersverteilung vorhanden. Gegenüber der Kontrolle generierten weniger Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen Aktionspotentiale in Bursts oder waren inaktiv. Dahingegen zeigten signifikant mehr Purkinjezellen in NPC1-defizienten Mäusen tonische Aktivität. Diese tonische Aktivität wies gegenüber der Kontrolle eine signifikant reduzierte Aktionspotentialfrequenz und eine höhere Aktionspotentialregularität auf.

Eine Applikation des EAAT-Antagonisten DL-TBOA induzierte sowohl in Kontroll- als auch in NPC1-defizienten Mäusen eine Veränderung der initialen Aktivitätsmuster der Purkinjezellen. Während in Kontrollmäusen signifikant weniger Purkinjezellen ihr Muster wechselten, wenn eine hohe intrazelluläre Chloridkonzentration vorlag, waren es bei NPC1-defizienten Mäusen mehr.

Um zu bestimmen, ob dieser chloridabhängige Effekt dabei auf der EAAT4-Chloridleitfähigkeit basiert, wurde elektrophysiologisch das Gleichgewichtspotential der Purkinjezellen bestimmt. Das basale Gleichgewichtspotential unterschied sich dabei nicht zwischen NPC1-defizienten und Kontrollmäusen. Eine Aktivierung von EAAT4 mittels L-Aspartat verschob das Gleichgewichtspotential in NPC1-defizienten Mäusen signifikant zu negativeren Werten. Eine Koapplikation mit DL-TBOA reduzierte das Maß der Potentialverschiebung, wobei diese weiterhin signifikant war. In Kontrollmäusen hatten weder die L-Aspartat- noch die Koapplikation mit DL-TBOA einen Effekt auf das Gleichgewichtspotential. Western Blot Analysen zeigten jedoch, gegenüber Kontrollmäusen, eine signifikant reduzierte zerebelläre Expression von EAAT1, 2 und 4 sowie des EAAT4-stabilisierenden Proteins β III Spektrin. Dies könnte den unterschiedlichen Effekt der EAAT-Inhibition auf die intrinsische Aktivität erklären.

Neben der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung wurde die inhibitorische synaptische Transmission zu Purkinjezellen untersucht. Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen zeigten eine erhöhte basale Frequenz GABAerger inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSC) gegenüber den Kontrollmäusen. In signifikant weniger Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen konnte die IPSC-Frequenz über eine NMDA-Applikation gesteigert werden. In den Purkinjezellen, deren IPSC-Frequenz sich steigerte, war die Frequenzerhöhung gegenüber den Kontrollmäusen geringer.

Es ist beschrieben, dass NMDA einen IPSC-frequenzsteigernden Effekt besitzt. Dieser beruht auf der Induktion eines Kalziumeinstromes, welcher die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und in einer Veränderung der Oberflächenexpression von GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren in präsynaptischen Interneuronen der Purkinjezellen mündet. Daher wurden mithilfe von Western Blot Analysen die zerebelläre Expression von GluA2, der PKC-phosphorylierten Form P-Ser880-GluA2 und die Gesamtmenge an PKC-phosphorylierten Proteinen bestimmt. Während in jungen, 22 Tage alten, NPC1-defizienten Mäusen die GluA2-Expression sich nicht signifikant von denen der Kontrollmäuse unterschied, war diese in alten, 55 Tage alten, Mäusen signifikant reduziert. Die Menge an P-Ser880-GluA2 war in beiden Altersgruppen signifikant

in NPC1-defizienten Mäusen reduziert, wobei das Verhältnis von GluA2 zu P-Ser880-GluA2 gleich blieb. In jungen NPC1-defizienten Mäusen war die Gesamtmenge von PKC-phosphorylierten Proteinen gegenüber den Kontrollmäusen reduziert und in alten signifikant erhöht.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die intrinsische Spontanaktivität, als auch die GABAerge synaptische Transmission in Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen verändert waren.

Dabei ist es möglich, dass beide funktionellen Veränderungen auf einer reduzierten Expression von EAAT basieren. Der funktionelle Einfluss der reduzierten EAAT-Expression kann dabei auf der reduzierten Chloridleitfähigkeit und/oder der reduzierten Glutamattransportkapazität basieren. Ein direkter Einfluss der Chloridleitfähigkeit von EAAT4 auf die Aktivität der Purkinjezelle konnte hier jedoch nicht endgültig geklärt werden.

Eine weitere Auswirkung der reduzierten EAAT-Expression könnte in einer reduzierten Wiederaufnahme des Neurotransmitters Glutamat im Kleinhirn von NPC1-defizienten Mäusen liegen, welches dann extrasynaptisch z. B. NMDA-Rezeptoren aktivieren kann. Dies hätte Einfluss auf die inhibitorische synaptische Transmission zu Purkinjezellen. Gleichzeitig könnte dies die Aktivität der PKC beeinflussen, was die Regulation der Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren stört.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen der Aktionspotentialgenerierung und inhibitorischen synaptischen Transmission von Purkinjezellen sowie der zerebellären EAAT-Expression erweitern das Bild der Dysfunktion und Degeneration von Purkinjezellen in NPC1, welche zur Ataxie führen. Gleichzeitig konnte bestätigt werden, dass Störungen der PKC-Funktion vorliegen, wobei diese über die bisher vermutete Dysfunktion hinausgehen, wie die Hypophosphorylierung von Ser880-GluA2 bei gleichzeitiger Hyperphosphorylierung der Gesamtmenge der PKC-phosphorylierten Proteine zeigte. Ziel weiterer Studien ist es daher, den Zusammenhang der hier beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen in NPC1 zu identifizieren und weiter zu charakterisieren. Auf dieser Grundlage kann dann geprüft werden, ob pharmakologische Interventionen, z. B. PKC-Aktivatoren, die pathophysiologischen Veränderungen in NPC1 korrigieren und damit die Therapieoption für NPC1-Patienten erweitern können.

1 Einleitung

1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C

Morbus Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine autosomal-rezessive lysosomale Speichererkrankung mit einer Prävalenz von 1:100.000-1:150.000 (Tang et al. 2010). Genetische Ursache für NPC sind Mutationen in den Genen *NPC1* (95 % der Fälle) oder *NPC2* (5 % der Fälle) was zu einer Unterteilung der Erkrankung in Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) und Typ C2 führt, deren Phänotyp sich jedoch gleicht (Lloyd-Evans und Platt 2010; Tang et al. 2010). Beide Gene codieren für Cholesteroltransporter, welche in späten Endosomen und Endolysosomen lokalisiert sind (Tang et al. 2010). Cholesterol ist ein bipolares Sterol, welches zu 90 % endogen synthetisiert wird (Myant 1973). Die restliche Menge wird dem Körper über die Nahrung zugeführt (Myant 1973). Es ist ein essenzieller Bestandteil der Zellmembran und ist zudem Ausgangsstoff der Steroidhormon- und Gallensäuresynthese (Maxfield und Wüstner 2002). Im zentralen Nervensystem ist Cholesterol notwendig für die Stabilität und Funktionalität der Plasmamembran, der Lipid Rafts, der synaptischen Vesikel und der Myelinisierung von Axonen (Abb. 1; Tang et al. 2010). Zudem werden aus Cholesterol Neurosteroide synthetisiert (Melcangi et al. 2014), wobei die Blut-Hirnschranke verhindert, dass Plasmalipoproteine das Gehirn mit Cholesterol versorgen können (Orth und Bellosta 2012).

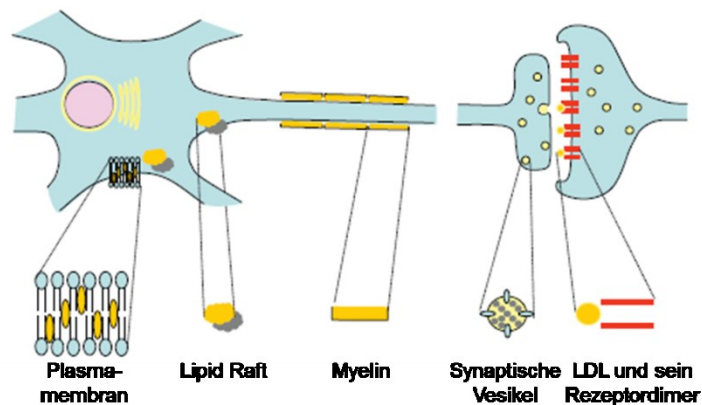


Abb. 1 Cholesterol als strukturelles Element in Neuronen.

Der Cholesterolgehalt ist essentiell für die Funktion von der Plasmamembran, der Myelinschicht der Axone und der Lipid Rafts. Zudem spielt er eine wichtige Rolle bei der Vesikelaufnahme und -abgabe. Entnommen und modifiziert aus Tang et al. (2010).

Aus diesem Grund wird im Gehirn Cholesterol weitestgehend *de novo* in Neuronen und Gliazellen synthetisiert. Während der Reifung reduziert sich die Fähigkeit der Neurone Cholesterol selbst herzustellen und sie werden abhängig von Cholesterol, das Astrozyten bilden

und in Apolipoprotein E-positiven Vesikel an die Neurone geliefert wird (Orth und Bellosta 2012). Diese Vesikel binden an Low-Density-Lipoprotein-Rezeptoren (LDL-Rezeptoren) der Neurone und werden endozytiert (Orth und Bellosta 2012; Tang et al. 2010). Im weiteren Verlauf reifen die endozytierten Vesikel zu späten Endosomen, die dann mit Lysosomen verschmelzen (Tang et al. 2010). Die NPC1- und NPC2-Proteine sind notwendig um das Cholesterin aus den späten Endosomen und Lysosomen zu transportieren und somit für den weiteren Metabolismus zur Verfügung zu stellen (Abb. 2; Chang et al. 2006).

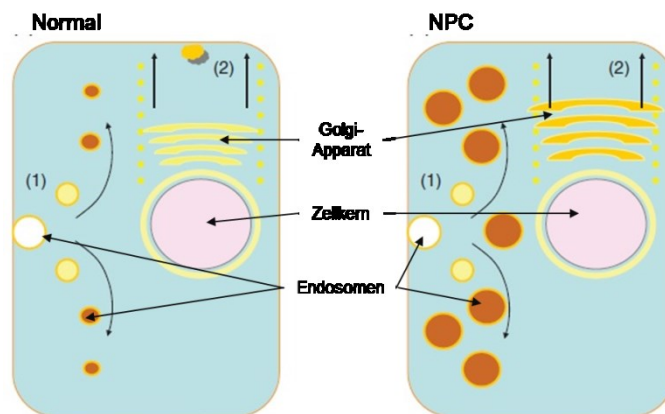


Abb. 2 Cholesterolaufnahme (1) und Transport (2) in gesunden und NPC1- bzw. NPC2-defizienten Zellen. Während bei gesunden Zellen (links) Cholesterin aus den Endosomen heraus transportiert und über den Golgi-Apparat per Vesikel an die Membran geschickt wird, akkumuliert dieses bei NPC1/2-Defizienz in den Endosomen und dem Golgi Apparat und stört damit deren Funktion (rechts). Abbildung entnommen und modifiziert aus Tang et al. (2010).

Der genaue Mechanismus, wie NPC1 und NPC2 das Cholesterin Herausschleusen ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass die beiden Proteine interagieren (Peake und Vance 2010). Das im endosomalen und lysosomalen Lumen vorhandene NPC2 bindet Cholesterin und übergibt dieses an das membrangebundene NPC1, wodurch es über einen unbekanntem Mechanismus ins Zytosol transportiert wird (Tang et al. 2010). Ebenfalls beschrieben wurde, dass NPC2 selbst in der Lage ist Cholesterin in die Membran der späten Endosomen und Lysosomen einzubauen und somit den Abtransport einzuleiten (McCauliff et al. 2011). Mutationen im NPC1- oder NPC2-Protein verhindern diesen Abtransport und es kommt zu einer Akkumulation cholesterinreicher später Endosomen und Lysosomen innerhalb der Zelle, während gleichzeitig die endogene Cholesterinsynthese hochreguliert wird, was die Akkumulation weiter voranschreiten lässt (Tang et al. 2010). Neben Cholesterin enthalten die späten Endosomen und Lysosomen auch Sphingomyelin, Glycosphingolipide und Sphingosin (Lloyd-Evans und Platt 2010; Erickson 2013).

Die Symptomatik von NPC erstreckt sich von Defekten in Leber, Lunge und Milz zu neurologischen Beeinträchtigungen wie z. B. motorischen Störungen, Epilepsie, Demenz und Beeinträchtigung im Lernen (Tang et al. 2010). Histologisch können Lipideinschlüsse in Neuronen und Gliazellen des Kortex, der *Substantia nigra*, der Amygdala, sowie der *Cornu ammonis 1* (CA1) Region des Hippokampus und des Kleinhirns gefunden werden (Tang et al. 2010; Reid et al. 2004). Morphologisch weisen Neurone zudem ektopische Dendriten und Meganeuriten auf (Tang et al. 2010). Als Folge der neurodegenerativen Prozesse tritt vor allem ein Verlust von Purkinjezellen im Kleinhirn und Neuronen im Thalamus und im geringeren Ausmaß im Neokortex, Neostriatum und Hippokampus auf (Tang et al. 2010). Gliazellen werden aktiviert und proliferieren, was zu einer Astrogliose führt (Reid et al. 2004). Durch die Beeinträchtigung der Reifung von Oligodendrozyten kommt es zu Störungen in der Myelinbildung (Yu und Lieberman 2013).

Im Gegensatz zu anderen Geweben ist der Cholesterolgehalt im Gehirn bei NPC nicht erhöht. Das liegt daran, dass die Cholesterollakkumulation in den Zellen und die Demyelinisierung sich gegensätzlich auf den Cholesterolgehalt auswirken (Liu et al. 2010b). Karten et al. (2003) beobachteten *in vitro*, dass Neurone zwar über den LDL-Rezeptor erhaltenes Cholesterol in Endosomen in die Axone transportieren, endogen synthetisiertes Cholesterol jedoch signifikant in Axonen reduziert ist (Karten et al. 2003). Da jedoch externes Cholesterol bei NPC1-Defizienz nicht zu einer normalen Axonregeneration führt, wenn die endogene Synthese inhibiert wird, wird vermutet, dass das Cholesterol nicht die Endosomen verlassen kann (Karten et al. 2003). Im Kleinhirn wurde zudem festgestellt, dass NPC1-Defizienz zu einer veränderten Morphologie synaptischer Vesikel führt (Karten et al. 2006). Dies hat auch funktionelle Auswirkungen, welche unter 1.3, nach einer Einführung zum Kleinhirn, erläutert werden.

1.2 Funktionen und Eigenschaften des Kleinhirns

Im Menschen befindet sich das Kleinhirn inferior vom Großhirn und posterior vom Stammhirn und ist über drei Kleinhirnstiele mit dem Stammhirn verbunden (Abb. 3; Martini et al. 2013). Von posterior betrachtet, ist das Kleinhirn in zwei Hemisphären geteilt, welche zentral durch den Kleinhirnwurm getrennt werden (Martini et al. 2013). Zudem befindet sich anterior und inferior jeder Hemisphäre ein Flocculus (Martini et al. 2013). Diese anatomischen Bereiche erhalten unterschiedliche Afferenzen (Lehmann-Horn 2011). Basierend auf den Afferenzen wird das Kleinhirn dabei in das Vestibulocerebellum, das Spinozerebellum und das Pontocerebellum gegliedert (Lehmann-Horn 2011). Dabei liegt im Menschen das Vestibulocerebellum im Flocculus und Kleinhirnwurm, das Spinozerebellum im

Kleinhirnwurm und der *Pars intermedia* der Hemisphären (Lehmann-Horn 2011). Das Pontozerebellum befindet sich in den *Pars lateralis* der Kleinhirnhemisphären (Lehmann-Horn 2011). Die drei Kleinhirnbereiche erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Das Vestibulozerebellum ist im Wesentlichen für die Gleichgewichtsregulation und Augenstabilisation während Bewegungen zuständig (Lehmann-Horn 2011). Das Pontozerebellum ist in der Bewegungsplanung involviert, während das Spinozerebellum die Bewegungsdurchführung und Zielmotorik sowie die Geh-, Steh- und Stützmotorik unterstützt (Lehmann-Horn 2011). Da die funktionellen Experimente im Spinozerebellum durchgeführt wurden, wird sich im Folgenden auf dieses System konzentriert. Das Spinozerebellum erhält eine Efferenzkopie des Motorkortex und verrechnet diese mit einer Afferenzkopie der spinalen Relaiskerne (Lehmann-Horn 2011). Das dadurch berechnete Differentialsignal verlässt das Spinozerebellum und wird an den *Nucleus ruber* gesendet und dient bei Bewegungen zur Koordination der Stütz- und Zielmotorik sowie evtl. Kurskorrekturen (Lehmann-Horn 2011). Daher führen Ausfälle im Spinozerebellum zur Ataxie.

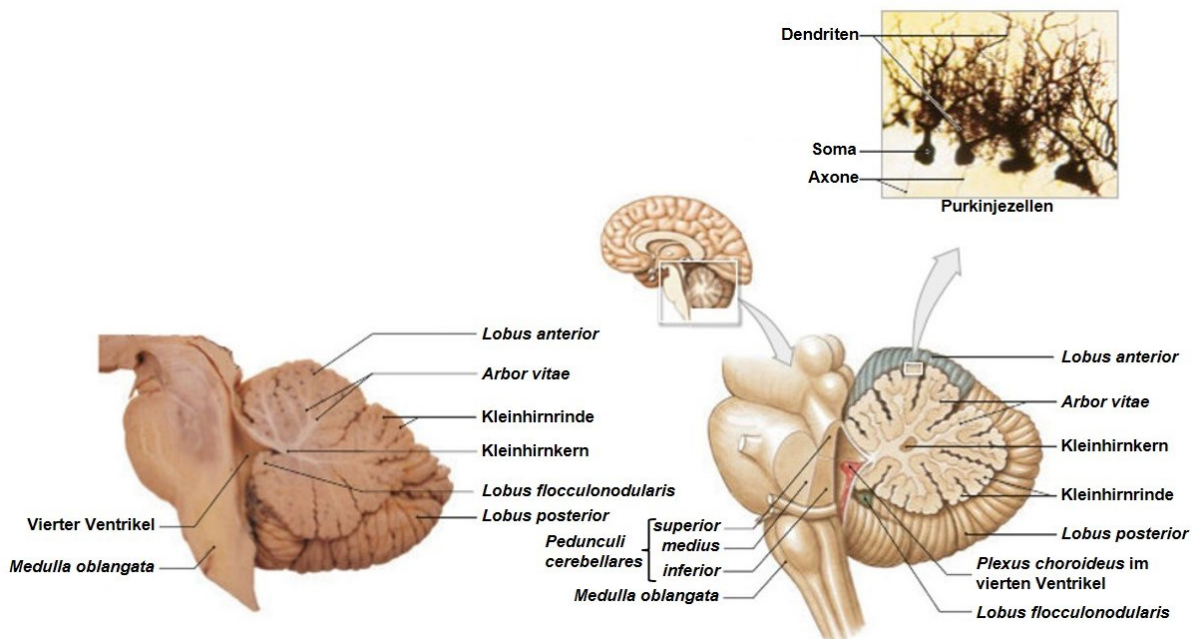


Abb. 3 Anatomie des Kleinhirns.

Durch die ausgeprägte Faltung des Kleinhirns entstehen die Kleinhirnlappen (*Folia cerebelli*), deren Summe die Struktur des Lebensbaumes (*Arbor vitae*) bilden. Die Afferenzen des Kleinhirns verlaufen im unteren und mittleren Kleinhirnstiel (*Pedunculus cerebellares inferior + medius*), während die Efferenzen im oberen Kleinhirnstiel verlaufen (*Pedunculus cerebellares superior*). Abbildung entnommen und modifiziert aus Martini et al. (2013).

Auf zellulärer Ebene besteht das Kleinhirn aus der Kleinhirnrinde und dem Kleinhirnmark (Abb. 4 A; Lehmann-Horn 2011). Letzteres besteht mit Ausnahme der tiefen Kleinhirnkerne aus Axonen der Afferenzen und Efferenzen des Kleinhirns (Martini et al. 2013). Die Rinde besteht aus drei Schichten. Die innerste, die Körnerschicht, wird von neuronaler Seite weitestgehend von den Somata der Körnerzellen gebildet, welche zudem die einzigen glutamatergen Neurone der Kleinhirnrinde sind (Huppelsberg und Walter 2005; Lehmann-Horn 2011). Die Körnerzellen werden dabei glutamaterg von Moosfasern, der Afferenz der Kleinhirnrinde, innerviert (Abb. 4 A, B; Huppelsberg und Walter 2005; Lehmann-Horn 2011). Zusätzlich befinden sich auch GABAerge Interneurone (GABA = γ -Aminobuttersäure), wie Golgizellen und Körnerzellen, in der Körnerschicht (Lehmann-Horn 2011; Huppelsberg und Walter 2005). Die mittlere Schicht, die Purkinjzellschicht, enthält die Somata der Purkinjzellen (Huppelsberg und Walter 2005; Lehmann-Horn 2011). Diese sind zudem mit den Somata der Bergmanngliazellen assoziiert, wobei im Mittel acht Bergmanngliazellen eine Purkinjzelle umgeben (Reichenbach et al. 1995). Die Molekularschicht an der Kleinhirnoberfläche besteht weitestgehend aus den Axonen der Körnerzellen, den Parallelfasern, und den Dendritenbäumen der Purkinjzellen (Lehmann-Horn 2011). An den Dendritenbäumen ziehen sich auch die Ausläufer der Bergmanngliazellen hoch (Buffo und Rossi 2013). Studien in Ratten zeigten, dass eine Purkinjzelle in der Regel von 100.000-200.000 Parallelfasern innerviert wird, wobei jede Parallelfaser an mehreren hundert Purkinjzellen jeweils eine Synapse ausbildet (Napper und Harvey 1988; Huang und Huang 1998). Anders sieht es mit dem anderen exzitatorischen Eingang der Purkinjzellen aus, den aus der im Stammhirn lokalisierten unteren Olive aufsteigenden Kletterfasern. Diese umwickeln jeweils den Dendritenbaum von bis zu zehn Purkinjzellen, wobei jede Purkinjzelle von nur einer Kletterfaser, aber mit zahlreichen Synapsen, innerviert wird (Huppelsberg und Walter 2005). Inhibitorische Eingänge bekommt die Purkinjzelle somatisch von Korbzellen und dendritisch von Sternzellen, welche beide GABAerg sind und in der Molekularschicht liegen (Abb. 4 B; Huppelsberg und Walter 2005). Die Axone der Purkinjzellen steigen in die Kleinhirnkerne ab bzw. innervieren mit Axonkollateralen Interneurone in der Kleinhirnrinde (Abb. 4 A; Lehmann-Horn 2011; Witters et al. 2016). Als GABAerge Neuronen inhibieren Purkinjzellen die von ihnen innervierten Neurone (Abb. 4 B; Huppelsberg und Walter 2005). Für die Aktivierung der Purkinjzelle ist keine synaptische Stimulation notwendig, sie können intrinsisch Aktionspotentiale in verschiedenen Mustern generieren (Raman und Bean 1999; Womack und Khodakhah 2002). Eines davon ist das

trimodale Muster, in dem nach einer tonischen Phase Aktionspotentialbursts und abschließend eine inaktive Phase folgen (Abb. 5; Engbers et al. 2013; Womack und Khodakhah 2002).

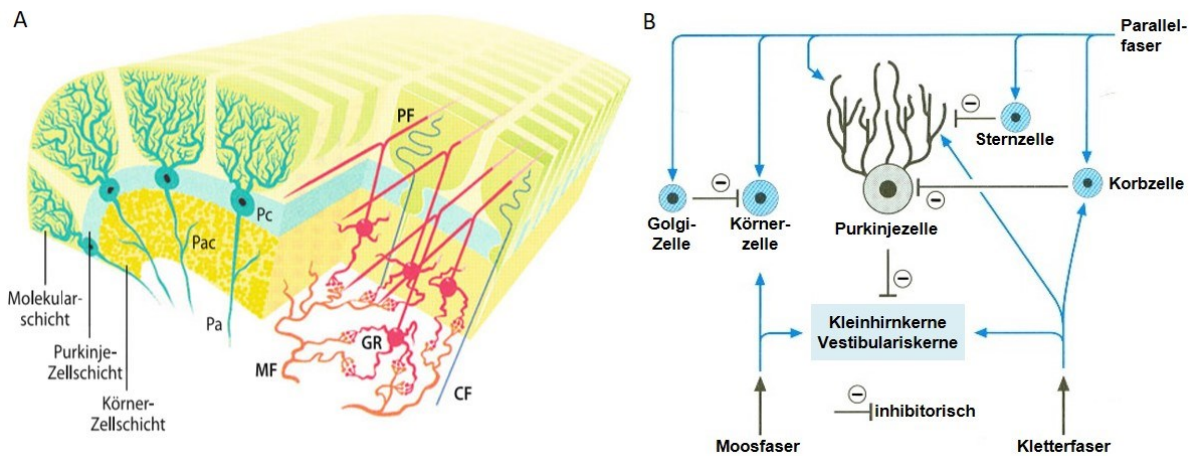


Abb. 4 Aufbau und synaptische Verschaltung der Kleinhirnrinde.

Die Kleinhirnrinde ist in Molekularschicht, Purkinjezellschicht und Körnerschicht aufgeteilt (A). Die Körnerschicht besteht weitestgehend aus Körnerzellen (GR), die von den Moosfasern (MF) innerviert werden und deren Axone in die Molekularschicht aufsteigen. Diese Axone, die Parallelfasern (PF), innervieren die Dendritenbäume der Purkinjezellen (PC), deren Somata in der Purkinjezellschicht liegen (A). Die Axone der Purkinjezellen (Pa) steigen in die Kleinhirnrinde ab bzw. bilden rückläufige Axonkollaterale (Pac; A). Aus der unteren Olive steigen die Kletterfasern (CF) auf und innervieren den Dendritenbaum der Purkinjezellen (A). Nicht in A abgebildet sind die zerebellären Interneurone. Die Körnerzellen stellen die einzigen exzitatorischen Neurone der Kleinhirnrinde dar, während die anderen inhibitorische Neurone sind (B). Die Moosfasern und die Kletterfasern sind die afferenten Eingänge der Kleinhirnrinde, während die Purkinjezellaxone die einzige Efferenz darstellen (B). Abbildung A entnommen und modifiziert aus Lehmann-Horn (2011) und Abbildung B aus Huppelsberg und Walter (2005).

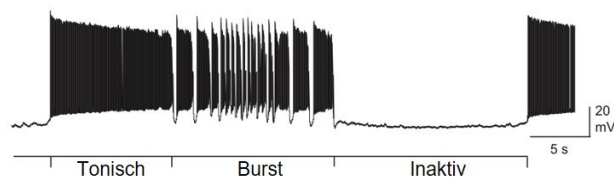


Abb. 5 Trimodale Purkinjezellaktivität

Purkinjezellen können intrinsisch Aktionspotentiale unter anderem als trimodales Muster generieren. In diesem folgen nach einer tonischen Phase Aktionspotential Bursts und abschließend eine inaktive Phase. Abbildung entnommen und modifiziert aus Engbers et al. (2013).

Welche Ionenkanäle diese Eigenaktivität generieren ist derzeit noch nicht vollständig geklärt (Masoli et al. 2015). Was jedoch bekannt ist, ist dass sich der Ionenkanalbesatz der Membran in den Kompartimenten der Purkinjezelle unterscheidet (Abb. 6; Masoli et al. 2015). Während die distalen Dendriten spannungsgesteuerte Kalziumkanäle aufweisen, sind dagegen keine

spannungsgesteuerten Natriumkanäle in diesem Kompartiment vorhanden (Masoli et al. 2015). In den proximalen Dendriten, Soma und Axon werden wiederum spannungsgesteuerte Natriumkanäle exprimiert, während die Expression von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen in diesen Kompartimenten gering ist (Masoli et al. 2015).

Ursprung der Spontanaktivität ist das Purkinjezellsoma, wie eine Studie an dissoziierten murinen Purkinjezellen zeigte. Hier war die Purkinjezellaktivität vergleichbar mit der, welche bei intakten Purkinjezellen und inhibierten synaptischen Eingängen in Kleinhirnschnitten gemessen wurde (Raman und Bean 1999). Die spontan generierten Aktionspotentiale werden als Simple Spikes bezeichnet (Hurlock et al. 2008) und können mit einer Frequenz von bis zu 300 Hz generiert werden.

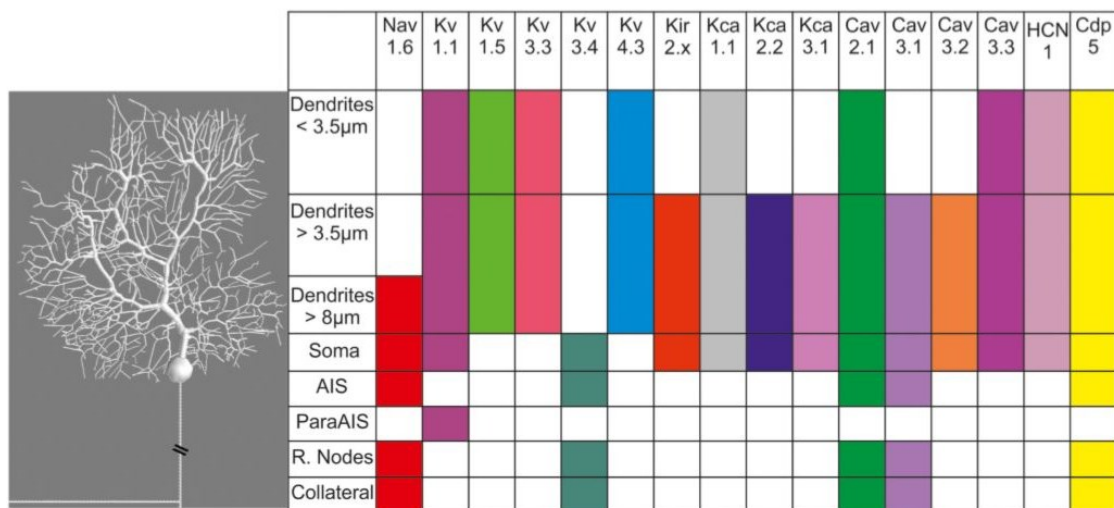


Abb. 6 Ionenkanäle und deren Lokalisation in einem Computermodell der Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen.

Die Expression spannungsgesteuerter Ionenkanäle von Purkinjezellen unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten. Die Expression spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Nav) ist auf das Axon, das Soma und den proximalen Dendritenbaum begrenzt. Im distalen Dendritenbaum vermitteln spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Cav) die depolarisierende Stromkomponente. Kir = einwärts gerichteter Kaliumkanal; Kca = kalziumsensitiver Kaliumkanal; HCN = hyperpolarisations-aktivierter, durch zyklische Nukleotide gesteuerter Kationenkanal; Cdp = kalziumpufferndes System. Abbildung entnommen und modifiziert aus Masoli et al. (2015).

Die intrinsische Aktionspotentialgenerierung wird durch die synaptischen Eingänge der Purkinjezelle moduliert (Engbers et al. 2013; Hurlock et al. 2008). Parallelfasern bilden eine Synapse pro Purkinjezelle aus, wodurch ihr Einfluss auf das Membranpotential räumlich begrenzt ist und eine Parallelfaseraktivierung in die Simple Spikes verrechnet wird (Cerminara und Rawson 2004; Kitamura und Kano 2013; Napper und Harvey 1988). Dahingegen führt eine Kletterfaseraktivierung zu einem kurzen Aktionspotentialburst mit anschließender Pause bis zu

den nächsten Simple Spikes, da die Kletterfaser viele Synapsen mit der Purkinjezelle hat und deren Aktivierung somit den gesamten Dendritenbaum der Purkinjezelle depolarisiert (Abb. 7 A; Hurlock et al. 2008; Kitamura und Kano 2013; Huppelsberg und Walter 2005). Dieser Burst wird als Complex Spike bezeichnet. Beide exzitatorischen Eingänge aktivieren spannungsabhängige Kalziumkanäle im Dendritenbaum. In mikrofluorimetrischen Kalziummessungen wird dies dadurch deutlich, dass eine Kletterfaseraktivierung zu einem Kalziumeinstrom im gesamten Dendritenbaum führt (Abb. 7 B, links; Kitamura und Kano 2013). Werden dagegen Parallelfasern stimuliert, wird nur in einem Teil oder in einzelnen Dornfortsätzen des Dendritenbaumes ein Kalziumeinstrom induziert (Abb. 7 B, rechts; Kitamura und Kano 2013). Die starke Depolarisation durch die Kletterfaserstimulation kann die Purkinjezelle zudem aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand heben oder umgekehrt senken, wodurch Purkinjezellen bistabil sind (Abb. 7 C; Engbers et al. 2013).

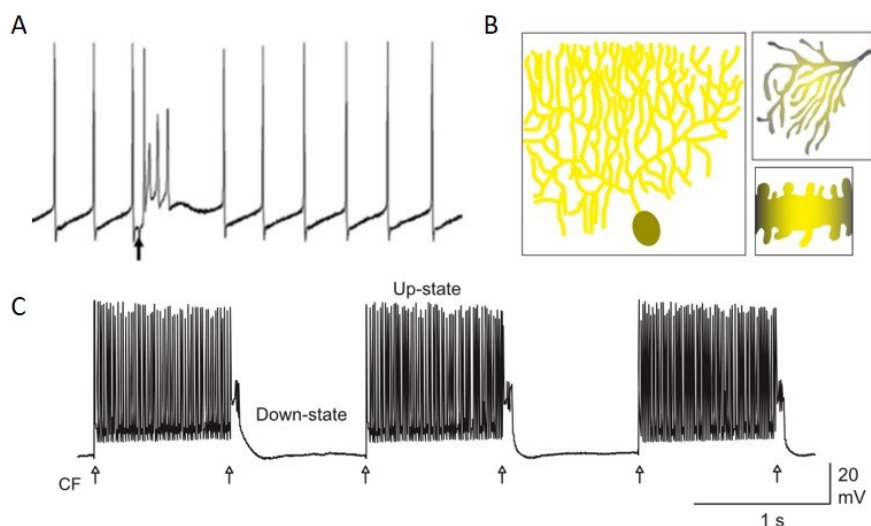


Abb. 7 Synaptischer Einfluss auf die Purkinjezellaktivität.

Bei aktivem Netzwerk kann bei den Aktionspotentialen zwischen Simple Spikes (intrinsische Aktionspotentiale und Parallelfasereingänge) und Complex Spikes (Kletterfasereingänge, Pfeil) unterschieden werden (A). Dabei unterbrechen Complex Spikes den Verlauf der Simple Spikes (A). In mikrofluorimetrischen Kalziummessungen führt eine Kletterfaseraktivierung zu einem Kalziumeinstrom im gesamten Dendritenbaum (B, links). Bei einer Parallelfaseraktivierung ist das Kalziumsignal auf einen Teil oder einzelne Dornfortsätze des Dendritenbaumes begrenzt (C, rechts). Die starke Depolarisation durch die Kletterfaserstimulation (Pfeile) kann die Purkinjezelle aus einem inaktiven (Down-state) in einen aktiven Zustand (Up-state) heben oder senken, wodurch Purkinjezellen bistabil sind (D). Abbildung A entnommen und modifiziert aus Hurlock et al. (2008), Abbildung B aus Kitamura und Kano (2013) und Abbildung D aus Engbers et al. (2013).

Das von Parallel- und Kletterfasern ausgeschüttete Glutamat wird von Neuronen mit Hilfe von EAAT3 (excitatory amino acid transporter, EAAT) und des für Purkinjezellen spezifischen EAAT4 aus dem Extrazellularraum entfernt (Takayasu et al. 2009). Glial werden EAAT1 und

EAAT2 exprimiert (Takayasu et al. 2009). In den exzitatorischen Synapsen der Purkinjezellen sind hauptsächlich EAAT1 auf den Bergmanngliazellen und EAAT4 exprimiert (Abb. 8; Takayasu et al. 2009; Chrobak und Soltys 2017). Dabei führt die Lokalisation der Glutamattransporter zu einer Kompartimentierung der Synapsen. In der Synapse wird Glutamat durch EAAT1 abtransportiert, während EAAT4 perisynaptisch exprimiert wird (Takayasu et al. 2009; Chrobak und Soltys 2017). Durch die höhere Affinität zu Glutamat entfernt EAAT4 das aus der Synapse überfließende Glutamat und verhindert damit eine Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) der Purkinjezelle (Takayasu et al. 2009). EAAT führen einen elektrogenen Antiport von einem Molekül Glutamat oder Aspartat, drei Na^+ und einem H^+ gegen ein K^+ durch, was einer Nettoladung von zwei positiven Ladungen pro transportiertem Glutamat oder Aspartat entspricht (Takayasu et al. 2009). Während des Transportes von Glutamat wird bei den EAAT zudem auch eine Chloridpore geöffnet, durch die Chlorid gemäß dem elektrochemischen Gradienten passiv fließt (Fairman et al. 1995). Dadurch haben EAAT auch die Eigenschaft eines glutamatgesteuerten Chloridkanals, wobei die Leitfähigkeit in dieser Folge abnimmt: EAAT4~EAAT5>EAAT1>EAAT3>EAAT2 (Trotti und Gibb 2005). Die Funktion der Chloridleitfähigkeit ist noch nicht gänzlich geklärt. Es wird vermutet, dass diese bei Purkinjezellen, durch den hyperpolarisierenden Chloridstrom, ein schnelleres Abklingen synaptisch induzierter Depolarisationen bewirkt (Dehnes et al. 1998). EAAT4 wird jedoch nicht gleichmäßig in allen Purkinjezellen exprimiert, sondern bevorzugt in denen, die auch das Enzym Aldolase C (Zebrin II) exprimieren (Dehnes et al. 1998; Gincel et al. 2007). Diese Aldolase C-positiven Purkinjezellen weisen gegenüber Aldolase C-negativen Purkinjezellen physiologisch eine höhere Resistenz gegen eine α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptor vermittelter toxischen Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Exzitotoxizität) auf, degenerieren jedoch bei Verlust von EAAT4 und EAAT1 (Perkins et al. 2018; Slemmer et al. 2007). Daher degeneriert in unterschiedlichen Pathologien bevorzugt eine der beiden Purkinjezellgruppen (Welsh et al. 2002; Sarna und Hawkes 2003; Perkins et al. 2016b). Gegenspieler der exzitatorischen Eingänge der Parallel- und Kletterfasern sind die inhibitorischen GABAergen Eingänge von Korb- und Sternzellen. Werden diese aktiviert, können exzitatorische Signale zu Purkinjezellen durch einen vorangehenden, hyperpolarisierenden Chloridstrom unterdrückt werden (Mittmann et al. 2005). Da die Interneurone ebenfalls von den Parallelfasern aktiviert werden, ermöglicht das Zusammenspiel zwischen Parallelfaser-, Kletterfaser- und GABAergem Eingang eine Modulation der

intrinsischen Aktionspotentialgenerierung bestimmter Purkinjezellgruppen und somit die korrekte Ausführung von Bewegungen (Dizon und Khodakhah 2011). Gerät dieses System aus dem Gleichgewicht werden die Neurone der tiefen Kleinhirnerne nicht mehr korrekt inhibiert und es kommt zu Störungen der Muskelkoordination und somit zu einer zerebellären Ataxie (Shakkottai et al. 2011; Walter et al. 2006).

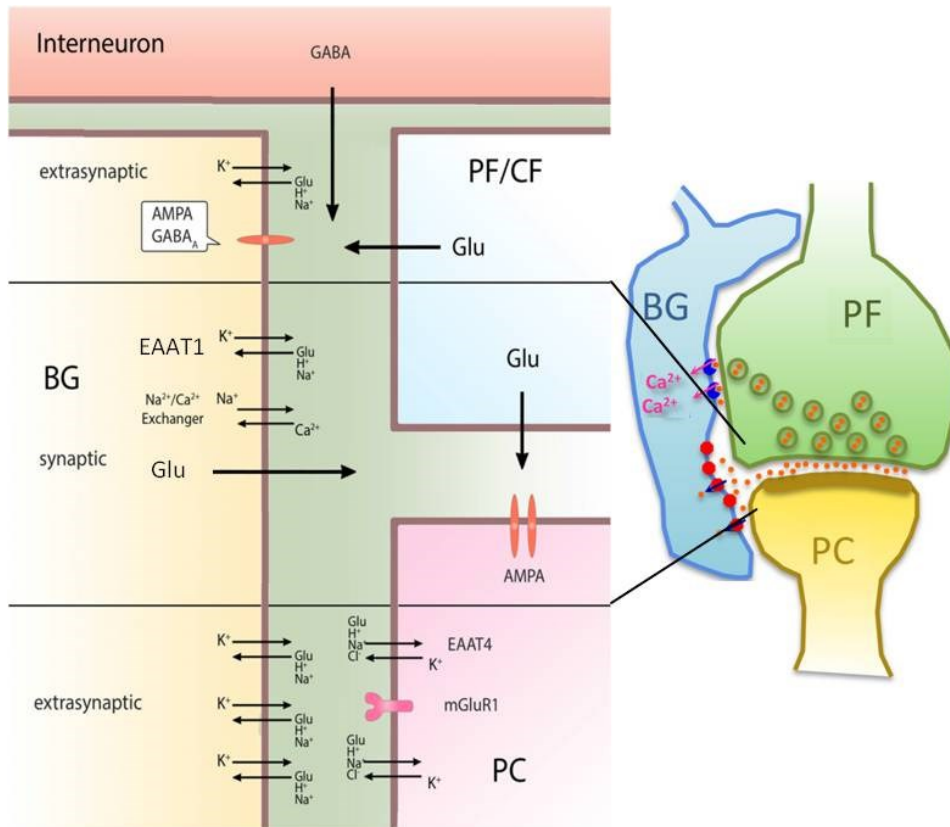


Abb. 8 Dreiteilige Synapsen an Purkinjezellen.

Parallelfasern (PF) bzw. Kletterfasern (CF), Purkinjezellen (PC) und Bergmann-Gliazellen (BG) bilden dreiteilige Synapsen. In diesem Aufbau schütten Parallel- und Kletterfasern Glutamat (Glu) synaptisch zu Purkinjezellen und extrasynaptisch zu Bergmann-Gliazellen aus und aktivieren dort lokalisierte AMPA-Rezeptoren. Das ausgeschüttete Glutamat wird synaptisch über EAAT1 von Bergmann-Gliazellen aufgenommen, während überfließendes Glutamat extrasynaptisch von EAAT4 in Purkinjezellen transportiert wird. Letzteres begrenzt die Aktivierung von mGluR1 auf Purkinjezellen. Linke Abbildung entnommen und modifiziert aus Chrobak und Soltys (2017). Rechte Abbildung entnommen und modifiziert aus Buffo und Rossi (2013).

1.3 Beeinträchtigungen des Kleinhirns bei Morbus Niemann-Pick-Typ C und anderen Ataxien

Zur Erforschung von NPC1 und anderen Ataxien werden verschiedenste Mausmodelle der jeweiligen Erkrankung herangezogen (Loftus 1997; Elrick et al. 2010; Maue et al. 2012). In Mäusen werden die Kleinhirnlappen von anterior zu posterior als Lappen I-X bezeichnet, wobei Lappen I-V Teil des Spinozerebellums, Lappen VI-VIII Teil des Pontozerebellums und Lappen

IX und X Teil des Vestibulocerebellums sind (Hawkes 2001). Von anterior zu posterior reduziert sich das Verhältnis von Aldolase C-positiven zu Aldolase C-negativen Purkinjezellen (Zhou et al. 2014). NPC1-Mausmodelle zeigten, dass bevorzugt die Aldolase C-negativen Purkinjezellen progressiv degenerieren (Abb. 9; Sarna et al. 2003). Daher beinhalten am Ende der Lebensspanne von NPC1-defizienten (NPC1^{-/-})-Mäusen die Lappen I-IX fast keine Purkinjezellen mehr, während Lappen X kaum Purkinjezelldegeneration aufweist (Abb. 9; Sarna et al. 2003). Dabei zeigte eine Studie, dass ein Knockout von NPC1 in Purkinjezellen ausreichend ist um die Degeneration zu induzieren (Elrick et al. 2010; Yu et al. 2011). Dies ist jedoch kein Beweis dafür, dass die Pathophysiologie rein auf einem intrinsischen Mechanismus der Purkinjezellen beruht und andere Zellen nicht involviert sind. In β III Spektrin-Knockout-Mäusen, einem Modell der spinocerebellären Ataxie 5 (spinocerebellar ataxia 5, SCA5), führt die Mutation in der Krankheitsprogression zu einer geringeren Expression von EAAT1 in Bergmanngliazellen (Perkins et al. 2010). Dabei wird vermutet, dass durch den Wegfall des Transporters Glutamat akkumuliert und somit die Purkinjezelldegeneration induziert (Perkins et al. 2010). Im Kleinhirn exprimieren aber nur Purkinjezellen β III Spektrin, was dafür spricht, dass diese mit den Bergmanngliazellen kommunizieren und somit die Reduktion von EAAT1 induzieren (Perkins et al. 2010). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch in NPC1 zur Purkinjezelldegeneration führen, denn die Degeneration Aldolase C-negativer Purkinjezellen kann auch in EAAT1-Knockout-Mäusen beobachtet werden (Perkins et al. 2018). Byun et al. (2006) zeigten bereits reduzierte mRNA-Level von EAAT3 im Hippokampus von NPC1-defizienten Mäusen und Caporali et al. (2016) beschrieben reduzierte EAAT1-Proteinlevel in Kleinhirnen von 15 Tage alten Npc1^{nmf164}-Mäusen. Eine weitere mögliche Gemeinsamkeit in der Pathophysiologie von SCA5 und NPC1 könnte die Veränderung von β III Spektrin sein. In NPC1 wurden in humanen Zelllinien zytoskelettale Veränderungen beschrieben, was ein Indiz dafür ist, dass auch β III Spektrin, als ein membranzytoskelettales Protein, beeinträchtigt sein könnte (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Dabei sind weitere Überschneidungen zwischen der zerebellären Pathophysiologie von NPC1 und anderen erblichen Ataxien ebenfalls möglich, da Mutationen, die die Purkinjezellfunktion stören oder zu ihrer Degeneration führen, vielfältig sind. Bei den dominanten SCA und rezessiv vererbten Ataxien führen Mutationen in Genen von z. B. Ataxinen (SCA1-3, 7, 10), Ionenkanälen (SCA6, 13, 19/22, rezessive SCA10), Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (SCA11, 12, 14), Proteinen des Lipidmetabolismus (Abetalipoproteinämie, cerebrotendinöse Xanthomatose, NPC1) sowie einer breiten Palette

anderer Proteine zur Ataxie (Bird 1993; Anheim et al. 2012). Während sich die betroffenen Organe bzw. Organbereiche zwischen den verschiedenen erblichen Ataxien unterscheiden, ist ihnen eine Störung in der Funktion der Purkinjezellen oder gar deren Untergang gemein.

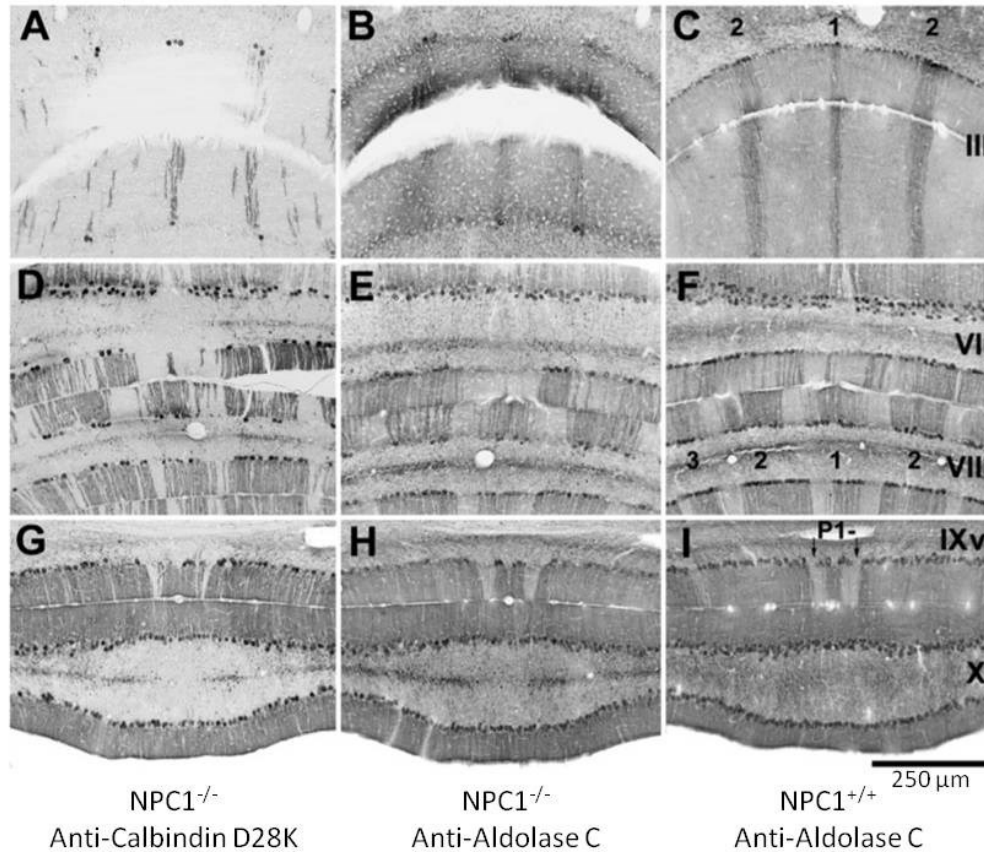


Abb. 9 Purkinjezelldegeneration in p60 NPC1^{-/-}-Mäusen.

Färbungen gegen den Purkinjezellmarker Calbindin D28K und Aldolase C von transversalen murinen Kleinhirnschnitten zeigen, dass vorwiegend Aldolase C-negative Purkinjezellen in NPC1 degenerieren (A, B, D, E, G, H). Während im Lappen III, in dem vorwiegend Aldolase C-negative Purkinjezellen lokalisiert sind, nahezu alle Purkinjezellen in p60 NPC1^{-/-}-Mäusen degeneriert sind, findet im Lappen X kaum eine Purkinjezelldegeneration statt (A, B, G, H). Die nicht degenerierten Purkinjezellen sind Aldolase C-positiv und deren Lage deckt sich mit der in NPC1^{+/+}-Mäusen (A-I). 1-3 in C und F bezeichnen die Aldolase C-positiven Streifen, P1- in I einen Aldolase C-negativen Streifen. Abbildung entnommen und modifiziert aus Sarna et al. 2003.

Dies ist ein Indiz dafür, dass sich die verschiedenen Pathophysiologien überschneiden und es gemeinsame Mechanismen gibt, die zur Störung und Degeneration der Purkinjezellen führen. Daher ist es möglich, dass sich vergleichbare Veränderungen der intrinsischen Aktionspotentialgeneration in Purkinjezellen in NPC1 wiederfinden, wie sie für andere Ataxien beschrieben wurden. Diesbezüglich wurde für NPC1 bisher beschrieben, dass in zehn Wochen alten Mäusen, in denen NPC1 spezifisch in Purkinjezellen nicht exprimiert wurde, keine Unterschiede zwischen der Aktionspotentialform, dem Membranwiderstand, sowie der

Zellkapazität zwischen Purkinjezellen aus Lappen V und X vorhanden sind (Elrick et al. 2010). Dabei zeigten die Purkinjezellen aus Lappen V jedoch morphologische Veränderungen (Elrick et al. 2010). Daten zur intrinsischen Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen in NPC1-Modellen im Vergleich zu Kontrollen liegen bisher nicht vor. Dahingegen wurden Veränderungen in der intrinsischen Spontanaktivität, das heißt der intrinsischen Entstehung von Aktionspotentialen in Purkinjezellen, in verschiedenen Studien zu SCA und der episodischen Ataxie 2 beschrieben (Kasumu et al. 2012b; Walter et al. 2006; Shakkottai et al. 2011). So generierten *in vitro* die Purkinjezellen von Kontrollmäusen tonisch Aktionspotentiale, während in SCA2 und SCA3 Mäusen vermehrt Aktionspotentialbursts oder Inaktivität gemessen wurden (Shakkottai et al. 2011; Kasumu et al. 2012b). Die veränderte intrinsische Aktionspotentialgenerierung konnte durch positive Modulatoren der kalziumabhängigen Kaliumkanäle $K_{Ca2.2}$ und $K_{Ca2.3}$ pharmakologisch korrigiert werden (Walter et al. 2006; Kasumu et al. 2012a). Diese wirkten sich dabei *in vivo* positiv auf die Pathologie der Mausmodelle aus und reduzierten die motorischen Beeinträchtigungen und die Purkinjezelldegeneration (Walter et al. 2006; Kasumu et al. 2012a). Dadurch sind Veränderungen der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung der Purkinjezellen auch ein therapeutisch relevanter Ansatzpunkt.

Da die intrinsische Aktionspotentialgenerierung über synaptische Eingänge moduliert wird, können auch diese für die Pathophysiologie in NPC1 relevant sein (Engbers et al. 2013; Hurlock et al. 2008). Verschiedene Studien befassten sich mit der synaptischen Transmission in NPC1. Im Hippokampus wurde in CA1-Pyramidenzellen eine gesteigerte spontane Freisetzung glutamaterger synaptischer Vesikel als erhöhte Frequenz miniatur exzitatorische postsynaptische Ströme gemessen, wohingegen die Frequenz postsynaptischer inhibitorischer Ströme unverändert war (Wasser et al. 2007; Frech et al. 2015). Zudem wurden in der hippokampalen CA1-Region Störungen der Regulation von AMPA-Rezeptoren und in Neuronen des Neokortex eine gestörte Langzeitpotentierung (LTP) beschrieben (D'Arcangelo et al. 2011; Avchalumov et al. 2012). In Purkinjezellen wurde bisher nur die exzitatorische synaptische Transmission untersucht. Dabei wurde, wie in CA1-Pyramidenzellen, eine erhöhte Frequenz der miniatur exzitatorischen postsynaptischen Ströme gefunden (Sun et al. 2011). Zudem ist die Langzeitdepression (LTD) der exzitatorischen Eingänge beeinträchtigt (Sun et al. 2011). Da in Purkinjezellen die LTD wahrscheinlich als Schutzmechanismus vor Exzitotoxizität dient, könnte der Verlust dieser zur Purkinjezelldegeneration in NPC1 beitragen (Sun et al. 2011). Der Gegenspieler der exzitatorischen synaptischen Transmission, die

inhibitorische Transmission, wurde in NPC1 bisher nicht in Purkinjezellen untersucht. Ist die Balance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer Transmission gestört, verändert sich die Erregbarkeit von Neuronen (Błaszczuk 2016). Immunfluoreszenzfärbungen lassen eine reduzierte inhibitorische synaptische Transmission zu Purkinjezellen in NPC1 vermuten, da Caporali et al. (2016) eine reduzierte Zahl GABAerger Synapsen in der zerebellären Molekularschicht gefunden haben. Dies könnte zu einer Übererregbarkeit der Purkinjezellen führen, die in Exzitotoxizität münden könnte.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Störungen in der Funktion von Purkinjezellen können zur Ataxie führen, einem Symptom in NPC1. Für eine Reihe von Ataxien sind Störungen der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen beschrieben. Jedoch gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Erkenntnisse darüber ob vergleichbare Störungen in NPC1, bzw. in einem Mausmodell der Erkrankung, zu beobachten sind. Daher wurden Erkenntnisse über veränderte Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen, die in anderen Ataxien beschrieben sind, als Vergleich herangezogen und untersucht, ob es Überschneidungen der pathophysiologischen Merkmale dieser Ataxien und NPC1 und damit sekundär in den Therapieoptionen, gibt. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Veränderungen in SCA5 gelegt, da Veränderungen des Zytoskeletts bei beiden Erkrankungen beschrieben sind und somit ein Indiz auf pathophysiologische Gemeinsamkeiten vorlag. Somit wurde geprüft, ob in NPC1-defizienten Mäusen Veränderungen in der intrinsischen Spontanaktivität vorliegen und inwieweit die zerebelläre Expression von Glutamattransportern aus der Familie der excitatory amino acid transporter (EAAT), sowie des Zytoskelettproteins β III Spektrin verändert ist und sich funktionell auf die Spontanaktivität auswirkt.

Darüber hinaus wurde untersucht ob, neben den in NPC1 beschriebenen Störungen der exzitatorischen synaptischen Transmission, Veränderungen der inhibitorischen synaptischen Transmission vorliegen, da diese ebenfalls die Purkinjezellaktivität beeinträchtigen können.

Für die Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde mithilfe des Western Blots die Proteinexpression von EAAT1, EAAT2 und EAAT4, sowie β III Spektrin im Kleinhirn NPC1-defizienter Mäuse bestimmt. Zudem wurde die intrinsische Aktionspotentialgenerierung, der funktionelle Einfluss speziell von EAAT4 auf diese, sowie die GABAerge synaptische Transmission der Purkinjezellen des Kleinhirns mittels der Patch-Clamp-Technik untersucht.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Antikörper, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Geräte und Software sind im Anhang in den Tabellen 1 bis 7 aufgelistet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen, Agonisten und Antagonisten sind unter 2.8 und 2.9 aufgeführt.

2.1 Haltung und Zucht von Mäusen

Die Zucht der Balb/cNctr-NPC1^{m1N}/J Wildtyp- (NPC1^{+/+}) und NPC1-defizienten (NPC1^{-/-}) Mäuse wurde in den Tierställen des Albrecht-Kossel-Instituts für Neuroregeneration durchgeführt und erfolgte in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und des Gentechnikgesetzes. Der genetische Hintergrund der Mäuse wurde von Loftus (1997) beschrieben und die Ursprungstiere bei The Jackson Laboratory erworben. Die Tiere wurden unter einem Tag/Nachtrhythmus von 12/12 h bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Für die Zucht wurden feste Trios aus zwei heterozygoten (NPC1^{+/-}) Weibchen und einem NPC1^{+/-} Männchen ab einem Alter von 60 Tagen für eine Woche zusammengesetzt. Danach wurden die Mäuse getrennt. 14 Tage nach der Trennung wurde für eine Woche täglich geprüft, ob Jungtiere geworfen wurden. Die Jungtiere wurden ab einem Alter von 18 Tagen von der Mutter getrennt. Männchen wurden in Geschwistergruppen von ein bis drei Tieren gehalten. Die Weibchen wurden in Gruppen von zwei bis drei Tieren gehalten. Gegebenenfalls wurden Weibchen unterschiedlicher Mütter zusammengelegt, um eine Einzelhaltung zu vermeiden.

2.2 Bestimmung des Genotyps

Der Genotyp der verwendeten Mäuse wurde mithilfe einer Polymerasen-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) zweimal bestimmt. Einmal nach dem Absetzen von der Mutter und einmal nach der experimentellen Präparation. Ausgangsmaterial waren hierbei Hautbiopsien des Ohres oder der Schwanzspitze. Für die DNA Extraktion wurde zu den Proben 75 µl DNA-Extraktionslösung gegeben und für 30 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde 75 µl Neutralisationslösung dazugegeben um den alkalischen pH-Wert zu neutralisieren. 2 µl der extrahierten DNA wurden zu 10 µl PCR-Mastermix gegeben. Die Primerpaare zur Detektion des Wildtyp- bzw. des Knockout-Allels wurden gemäß der Anleitung von The Jackson Laboratory (2017) gewählt. Das Primerpaar zur Detektion des Wildtyp-Allels hatte folgende 5'-3' Sequenz: Forward Primer CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG, Reverse Primer TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC. Zur Detektion des Knockout-Allels wurde folgende 5'-3' Sequenzen verwendet: Forward Primer TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC, Reverse Primer GGT GCT GGA CAG CCA AGT A.

Das PCR-Protokoll lautet wie folgt: 60 s 94 °C, 35x {30 s 94 °C, 30 s 67 °C, 30 s 72 °C}, 120 s 72 °C. Nach dem letzten Schritt wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt.

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurden diese in einem Agarosegel (1,5 % in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer + 8 µl/100ml Sybr® Safe DNA Stain) für 25 min bei 90 V getrennt. Unter UV-Licht konnte der Genotyp der Mäuse anhand der Anwesenheit und Größe der PCR-Produkte bestimmt werden (Abb. 10). Bei NPC1^{+/+}-Mäusen war eine 173 Basenpaare (Bp) große Bande, bei NPC1^{-/-}-Mäusen eine 475 Bp große Bande vorhanden. Heterozygote wiesen beide Banden auf.

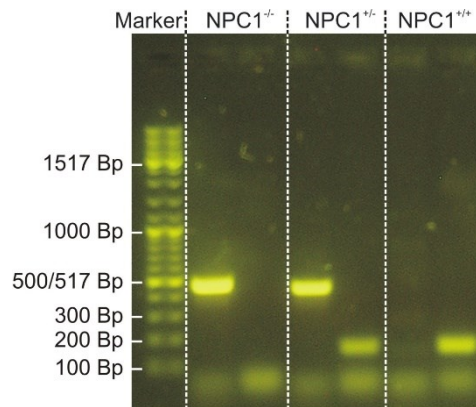


Abb. 10 Ergebnis einer Genotypisierung

Der Genotyp der verwendeten Mäuse wurde über eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese bestimmt. Das mutierte Allel führt zu einem 475 Bp langen PCR Produkt (links, NPC1^{-/-}), das unmutierte zu einem 173 Bp langen PCR Produkt (rechts; NPC1^{+/+}). Proben NPC1-heterozygoter Mäuse zeigen beide Banden in der Gelelektrophorese (mitte; NPC1^{+/-}).

2.3 Präparation akuter, parasagittaler Kleinhirnwurmschnitte

Die Präparation der Schnitte des Kleinhirnwurms erfolgte modifiziert nach Bischofberger et al. (2006).

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend dekapitiert. Der Kopf wurde in eiskalter, Carbogen begaster Extrazellulärlösung (EXS-Carbogen) ca. 10 s gekühlt und anschließend in eine Schale, gefüllt mit einem Mus aus gefrorener und flüssiger EXS-Carbogen, fixiert. Der Schädel wurde über das Hinterhauptsloch geöffnet und das Gehirn in eine Petrischale überführt, in der ein Kranz aus EXS-Carbogen-Mus vorbereitet war. Mit einer Rasierklinge wurde das Großhirn entfernt, die Hemisphären des Kleinhirns abgeschnitten und das Kleinhirn auf die Hemisphären-Schnittfläche gekippt um parasagittale Schnitte zu erhalten. Das Kleinhirn wurde auf einen mit Roti® coll 1 bedeckten Probensteller überführt und mit EXS-Carbogen-Mus zum Aushärten des Klebers bedeckt. Der Probensteller wurde in das Vibratom überführt und die Pufferwanne mit EXS-Carbogen-Mus und eiskalter EXS-Carbogen

gefüllt. Drei bis vier Schnitte des Kleinhirnwurms pro Maus wurden mit einem Vortrieb von 0,1 mm/s, einer Amplitude von 1 mm und einer Schnittdicke von 250 µm hergestellt. Nach Anfertigen der Schnitte wurden diese in begaster EXS-Carbogen für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur bis zur Verwendung (maximal 5 h nach Inkubation) gelagert.

2.4 Elektrophysiologie

2.4.1 Allgemeine Konfiguration

Das Patch-Clamp-Setup bestand aus einem Axioskop FS2 Mot mit einer Sensicam die über TillVision gesteuert wurde. Für die Patch-Clamp-Messungen wurde ein EPC10-Verstärker in Kombination mit der Steuersoftware Patchmaster 2.73.5-2.91 genutzt. Die Hirnschnitte wurden per Schwerkraft mit begaster EXS-Carbogen umspült. In einem Teil der Experimente wurde diese mittels einer Durchlaufheizung erwärmt, um eine Badtemperatur von 34 ± 1 °C zu erreichen. In einem Teil der Experimente wurden Substanzen fokal mit einem OctaFlow™ Systems appliziert. Der Puffer im OctaFlow™ konnte nicht begast werden, weswegen eine HEPES gepufferte Extrazellulärlösung (EXS-HEPES) eingesetzt wurde. Die Patchpipetten wurden mit einem DMZ-Universalpuller gezogen, wobei der Pipettenwiderstand abhängig von der verwendeten Intrazellulärlösung war. Das Grundprogramm des Pullers ist im Anhang in Tab. 8 einsehbar.

Alle Messungen erfolgten an Purkinjezellen, welche durch ihre Größe und Lage optisch identifiziert wurden. Die Messungen wurden bei 3 kHz gefiltert und mit 10 kHz digitalisiert. Um einen vollständigen Austausch der Intrazellulärlösung mit dem Zytosol zu gewährleisten, wurden die ersten fünf Minuten der Messungen nicht in die Analyse mit einbezogen.

2.4.2 Messung der Purkinjezellaktivitätsmuster

Die Messungen der spontanen Aktionspotentialgenerierung erfolgten an Schnitten von p45-p56 Mäusen bei 34 °C Badtemperatur. Es wurden Purkinjezellen im anterioren Bereich des Kleinhirns, in Lappen III-V untersucht. Dafür wurden Intrazellulärlösungen mit physiologischer (INK-Phys) und hoher (INK-High) Chloridkonzentration verwendet. Die Patchpipetten hatten mit diesen Lösungen einen Widerstand von 5-7 MOhm (INK-Phys) bzw. 3-5 MOhm (INK-High). Die Kapazitäten der Patchpipette und der Zellmembran, sowie der Serienwiderstand wurden kompensiert. Über ein Spannungssprungprotokoll wurde überprüft, ob es sich bei der Zelle tatsächlich um eine Purkinjezelle handelt (Protokoll siehe Tab. 1). Dafür wurde, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV, das Haltepotential schrittweise um

10 mV bis auf ein Potential von 40 mV erhöht. Zwischen jedem Schritt wurde das Haltepotential wieder auf -70 mV gesenkt. Purkinjezellen weisen sowohl einen initialen Einwärtsstrom auf, der ab -40 mV induziert wird und dessen Amplitude sich mit steigender Depolarisation verringert, als auch einen Auswärtsstrom auf, der sich mit steigender Depolarisation in seiner Amplitude steigert (Abb. 11). Der initiale Einwärtsstrom differenziert Purkinjezellen von Bergmanngliazellen, welche keine spannungsgesteuerten Natriumkanäle exprimieren (Bergles et al. 1997).

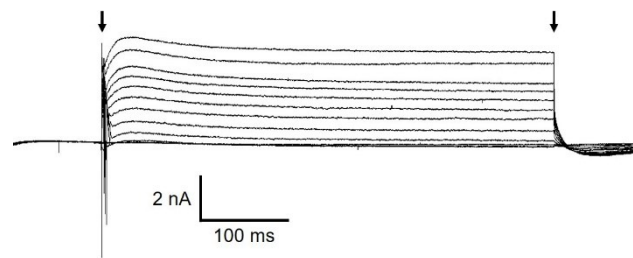


Abb. 11 Stromantworten einer Purkinjezelle auf ein Spannungssprungprotokoll

Spannungssprungprotokolle induzieren in Purkinjezellen Ströme. In 10 mV Sprüngen wurde das Haltepotential von -70 mV auf 40 mV erhöht. Überinandergelegt sind die schnell inaktivierenden Einwärtsströme (aufgetragen nach unten) und anhaltenden Auswärtsströme (aufgetragen nach oben) erkennbar. Die Pfeile markieren Beginn (links) und Ende (rechts) der Spannungssprünge an.

Die Aufnahme spontan generierter Aktionspotentiale erfolgte im Current-Clamp-Modus mit einer Verstärkung von 10 pA/mV bei einem Haltestrom von 0 pA und einer Abtastrate von 10 kHz. Zu Beginn der Messung wurde eine 10 minütige Kontrollphase aufgezeichnet. In einem Teil der Experimente wurde nach der Kontrollphase 50 μ M des EAAT-Antagonisten DL-Threo-beta-benzyloxyaspartat (TBOA) über das Bad appliziert. Nach der letzten Einspülung wurde mit einem Spannungssprungprotokoll geprüft, ob sich die Zelle noch an der Patchpipette befindet. Die Messung wurde abgebrochen, wenn die Zelle sich vorzeitig von der Pipette löste oder sich der Serienwiderstand zu stark erhöhte.

Die Aktionspotentiale der Aktivitätsmustermessungen wurden in Mini Analysis 6.0.3 (Synaptosoft Inc., USA) detektiert und das Aktivitätsmuster optisch bestimmt. Die Messungen tonisch aktiver Purkinjezellen wurden als ASCII-Datei exportiert und in R 3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, AU) kombiniert mit RStudio 0.98.1091 (RStudio, Inc., USA) auf ihre mittlere Aktionspotentialfrequenz und -regularität untersucht. Für letzteres wurde der Koeffizient der mittleren Abstände zwischen den Aktionspotentialen (Standardabweichung/Mittelwert der Abstände) berechnet.

2.4.3 Spannungsrampenmessungen

Zur Bestimmung der Verschiebung des Gleichgewichtspotentials durch eine EAAT-Aktivierung wurden während einer L-Aspartat-Applikation Spannungsrampenprotokolle ausgeführt. Die Messungen erfolgten in Purkinjezellen aus Lappen X, da diese eine höhere EAAT4-Expression aufweisen. L-Aspartat wurde mit dem Substanzapplikationssystem OctaFlow™ appliziert. EXS-HEPES wurde als Puffer im OctaFlow™ verwendet. Das Applikationsschema war hierbei, dass für 60 s EXS-HEPES, für 20 s L-Aspartat in EXS-HEPES und abschließend 8 s EXS-HEPES appliziert wurden. Während der Applikationen wurden Spannungsrampenprotokolle (30 ms bei -100 mV, dann für 120 ms die Spannungsrampe auf 20 mV (1 mV/ms) und 10 ms -70 mV) durchgeführt. Die Rampe der Kontrollphase startete bei Sekunde 58 und die der Applikationsphase 10 s nach Start der Applikation. Die zehnekündige Wartezeit in der Applikationsphase gewährte das Erreichen eines Equilibriums. Um die Aktivierung von spannungsabhängigen Natrium- und Kalziumkanälen zu verhindern, wurden diese mit 1 μ M Tetrodotoxin (TTX), 100 μ M Ni(II)Cl und 300 μ M CdCl₂ inhibiert. 1000 μ M Kynurensäure inhibierte ligandengesteuerte Glutamatrezeptoren, die durch L-Aspartat aktivierbar sind. In einem Teil der Experimente wurde 50 μ M TBOA dem EXS-HEPES hinzugefügt.

Die Spannungsrampen wurden für die Analysen als ASCII-Datei exportiert. Für das Gleichgewichtspotential (E_{GG}) wurde das Membranpotential (V_M) des Datenpunktes gewählt, bei dem die Stromamplitude (I) am nächsten bei 0 pA lag ($E_{GG} = \min(V_M(|I|))$). Ausreißer, die diese Methodik verfälscht hätten, wurden durch Begutachten der Stromrampen ausgeschlossen. Zur Bestimmung der L-Aspartat induzierten Verschiebung des Umkehrpotentials wurde das Umkehrpotential der Kontrollphase von dem der L-Aspartat-Applikation subtrahiert.

2.4.4 Messung inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSC)

Die IPSCs wurden in Kleinhirnschnitten von p19-p25 alten Mäusen bei Raumtemperatur in Purkinjezellen in Lappen III-V gemessen. Patchpipetten mit einem Widerstand von 2-4 MOhm (INK IPSC (Rudolph et al. 2016)) wurden für die Messungen verwendet. Die Messungen erfolgten im Voltage-Clamp-Modus bei einer Verstärkung von 2-5 pA/mV, einem Haltepotential von -70 mV und einer Abtastrate von 10 kHz. In einem Teil der Experimente wurde 20 μ M N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) mithilfe des OctaFlows™ appliziert. Das Applikationsschema war hierbei, dass nach einer 10-minütigen Kontrollphase für 5 min EXS-HEPES, für 3 min NMDA in EXS-HEPES und abschließend 8 s EXS-HEPES appliziert wurden. Um zu bestimmen, ob die gemessenen postsynaptischen Ströme GABAerger Natur

waren, wurde in einem Teil der Experimente zusätzlich $5 \mu\text{M}$ des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Gabazin dem Puffer hinzugefügt.

Die postsynaptischen Ströme wurden manuell in Mini Analysis detektiert. Die ersten fünf Minuten der Messungen wurden verworfen und die mittlere Frequenz aus den zweiten fünf Minuten berechnet. Zur Bestimmung des frequenzerhöhenden Effekts von NMDA wurden die Ereignistabellen aus Mini Analysis exportiert und die Frequenz über die Zeit in R berechnet. Dabei wurde die mittlere Frequenz von jeweils 15 s Abschnitten berechnet und auf die mittlere Frequenz der Minuten 2-4 der ersten EXS-HEPES-Applikation normiert. Qualitativ wurde eine Frequenzerhöhung detektiert, wenn während der NMDA-Applikation eine Erhöhung der Frequenz erkennbar war, die nach der Applikation abklang. Zur Quantifizierung wurde bei Messungen mit stabilem Frequenzverlauf während der EXS-HEPES-Applikation das Maximum der Frequenzerhöhung unter NMDA als x-Faches der Kontrollfrequenz (Fold Change) ermittelt.

2.5 Western Blot

2.5.1 Probenvorbereitung

55 Tage alte Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde bei Raumtemperatur wie in 2.3 beschrieben geöffnet und das Hirn aus dem Schädel entfernt. Das Hirn wurde mit begaster EXS-Carbogen gespült und das gesamte Kleinhirn mit Pinzetten vom Stamm- und Großhirn gelöst. Die präparierten Kleinhirne wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Proteinextraktion bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Während der Proteinextraktion wurden die Proben und Puffer auf Eis kühl gehalten. Die Kleinhirne wurden zusammen mit 1 ml RIPA-Lysepuffer in einen Zellhomogenisator gegeben und zerkleinert. Bei einem Gewicht der Kleinhirne von ca. 50 mg entspricht dies einem Gewichts-Volumen-Verhältnis von 1:20. Die Homogenate wurden 30 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Homogenate für 30 min bei 15.000 g bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand (Proteinlysate) überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mithilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kits gemäß Anleitung bestimmt.

Das Proteinlysate wurde mit autoklaviertem Aqua dest. auf eine Proteinkonzentration von $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, bzw. $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ für die EAAT1 Detektion, verdünnt. Pro eingesetzter Probe im Gel wurden $20 \mu\text{l}$ des verdünnten Proteinlysats mit $5 \mu\text{l}$ 5x Lämmli-Puffer gemischt, 10 min bei $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (bzw. $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der Detektion von phosphorylierten Proteinen) schüttelnd inkubiert und

1 min bei 4 °C bei 14.400 g zentrifugiert. Die vorbereiteten Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese wurde mit der Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell mit dazugehörigen Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (4-15 %) durchgeführt. Die Proben wurden aufgetaut und jede Probe zweimal pro Gel aufgetragen, wobei immer Proben von NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen auf jedem Gel vorhanden waren. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard eingesetzt. Die Proteine in der Probe wurden zuerst für 5 min mit 100 V Spannung gesammelt und dann für 25-30 min bei 300 V getrennt. Für den anschließenden halbtrockenen Proteinblot wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System mit Trans-Blot® Turbo™ Transfer Packs (Midi Format, 0.2 µm Nitrocellulose) verwendet und mit dem Universalprogramm für ein Midi-Gel durchgeführt. Nach Abschluss des Blots wurden die Membranen für 5 min mit trisgepufferter Salzlösung (Tris-buffered saline, TBS) gewaschen und 1 h mit 5 % Milchpulver oder bovinem Serumalbumin in TBS mit Tween® 20 (TBST) blockiert. Dabei wurden alle Inkubations- und Waschschrte auf einem Wipptisch durchgeführt. Anschließend wurde die Blocklösung verworfen und die Erstantikörperlösung gegen die Zielproteine für 2 h auf die Membranen gegeben. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit TBST wurde für 1 h die Erstantikörperlösung gegen die Haushaltsproteine GAPDH und β-Aktin dazugegeben und anschließend dreimal mit TBST gewaschen. Die Erstantikörperlösungen wurden bis zu viermal verwendet und zwischen den Einsätzen bei 4 °C bzw. bei einem längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert. Für die folgenden Schritte wurden die Membranen im Dunkeln inkubiert. Die Sekundäntikörperlösung wurde für 1 h auf die Membranen gegeben und im Anschluss dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Zum Abschluss wurden die Membranen auf Whatman®-Zellulosefilterpapier gelegt und getrocknet.

2.5.3 Visualisierung und Quantifizierung der Proteinsignale

Die getrockneten Membranen wurden mittels des Odyssey® Infrarot Imaging Systems und der dazugehörigen Anwendungssoftware Version 1.2 (LI-COR Biosciences, USA) eingescannt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe des Image Studio Lite 3.1.4 (LI-COR Biosciences, USA). Die Banden wurden in der Software markiert und lokal der Hintergrund subtrahiert. Ein Datenpunkt ist der Mittelwert der jeweils doppelt aufgetragenen Probe eines Blots. EAAT1 lag mit Signalen bei 55 kDa und 110 kDa sowohl als Mono- als auch als Dimer vor. Für die Analyse

wurden die Intensitäten beider Signale addiert. Zur Quantifizierung des Signals des Anti-P-Ser-PKC-Substrat-Antikörpers wurden die Intensitäten der kompletten Gelspuren addiert und zur Hintergrundkorrektur ein Bereich außerhalb der Gelspuren gewählt. Die Proteinsignale wurden auf β -Aktin normiert. Um verschiedene Membranen miteinander vergleichen zu können, wurden alle Proteinsignale einer Membran auf die mittlere Intensität der NPC1^{+/+}-Proben der Membran normiert.

2.6 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung basiert auf einem Protokoll von Abcam (2017).

200 μ m dicke Kleinhirnschnitte (Präparation siehe 2.3) bzw. 250 μ m dicke Schnitte von den elektrophysiologischen Messungen wurden in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte unter Schütteln dreimal für 10 min mit TBS-Triton gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsmöglichkeiten durch einstündige Inkubation mit 4 % Normal Goat Serum (NGS) in TBS-Triton blockiert. Bei 4 °C erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1 % NGS in TBS-Triton. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBS-Triton gewaschen und für 1 h mit dem Sekundärantikörper bzw. 5 μ g/ml Texas Red® Streptavidin in 1 % NGS in TBS-Triton im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte für 10 min mit DAPI in PBS gefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Schnitte auf Objektträger überführt, mit Mowiol DABCO überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt.

Die Visualisierung erfolgte mit einem BZ-8000K Mikroskop (KEYENCE, Deutschland). Für die Bilder die den gesamten Kleinhirnschnitt zeigen (Abb. 12 A-D) wurden vier Einzelbilder fusioniert. Für die Bilder mit der höheren Vergrößerung (Abb. 12 E-H; Abb. 13 C, D) wurden mittels z-Stack mehrere Bilder aufgenommen und mit der Full Focus Funktion der Analyser Software (KEYENCE, Germany) ein mittleres Bild berechnet.

2.7 Statistische Auswertung

Kontinuierliche Daten wurden weiter in „GraphPad Prism 6“ statistisch untersucht. Ausreißer wurden mit einem 1 % ROUT-Test (Robust regression and Outlier removal) detektiert und ausgeschlossen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten bzw. gepaarten, zweiseitigen t-Tests festgestellt. Für nominale Daten wurde in R ein Barnard's Exact-Test zur Signifikanzprüfung verwendet (Calhoun 2016).

Gruppen wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war.

Alle Werte im Text sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SfM) sowie der Gruppengröße (n) angegeben. In den Abbildungen sind die Mittelwerte \pm SfM als Balkendiagramme dargestellt. Zur besseren Übersicht, sind in den Abbildungsbeschriftungen nur die Mittelwerte der Ergebnisse angegeben.

Signifikanzen werden als * dargestellt, wobei * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$ stehen.

2.8 Lösungen

- Ca^{2+} / Mg^{2+} 10x: 20 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2
- DNA-Extraktionslösung: 25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA; pH 12
- DNA-Extraktionslösung (50x): 1,25 M NaOH, 10 mM EDTA
- Elektrophoresepuffer (10x): 250 mM TRIS, 2 M Glycin, 1 % SDS
- EXS-Carbogen: 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO_3 , 1,25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM Glukose, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ; 7,4 mit Carbogen/ NaOH
- EXS-Carbogen 10x: 1250 mM NaCl, 25 mM KCl, 260 mM NaHCO_3 , 12,5 mM NaH_2PO_4
- EXS HEPES: 151 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM Glukose, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ; 7,4 mit NaOH
- EXS HEPES (10x): 1510 mM NaCl, 25 mM KCl, 100 mM HEPES, 12,5 mM NaH_2PO_4
- INK-High: 140 mM KCl, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ; pH 7,2 mit KOH/ HCl
- INK-Phys: 130 mM K-D-Glukonat, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ; pH 7,2 mit KOH/ HCl
- INK IPSC: 125 mM CsCl, 20 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 0,5 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 2 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 0,5 mM Na-GTP, 0,1 % Neurobiotin™; pH 7,3 mit CsOH
- Laemmli-Puffer (5x): 125 mM TRIS, 20 % Glycerol, 2 % SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
- Neutralisationslösung: 40 mM Tris-HCl; pH 5
- Neutralisationslösung (50x): 2 M Tris-HCl
- PCR-Mastermix pro Probe: 1,2 μl Coral Load 10x PCR Puffer, 1,2 μl 10 mM Primermix, 0,25 μl dNTP-Mix, 0,24 μl 25 mM MgCl_2 , 0,12 μl Taq DNA Polymerase (5 u/ μl), 7 μl Aqua dest.
- TAE-Puffer: 40 mM TRIS-Acetat, 0,2 % 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8)

- TBS (10x): 200 mM TRIS, 1,37 M NaCl; pH 7,5
- TBST: 0,1 % Tween® 20 in 1x TBS
- TBS-Triton: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100; pH 7,5

2.9 Agonisten und Antagonisten der elektrophysiologischen Experimente

- CdCl: 300 µM Cadmiumchlorid in EXS-HEPES
- CdCl-Stock: 300 mM Cadmiumchlorid x H₂O in Aqua dest.
- DL-TBOA: 50 µM DL-TBOA in EXS-Carbogen bzw. EXS-HEPES
- DL-TBOA-Stock: 50 mM DL-TBOA in DMSO
- GABA: 1 mM in EXS-HEPES
- Gabazin: 5 µM SR-95531 in EXS-Carbogen
- Gabazin-Stock: 50 mM SR-95531 in Aqua dest.
- Kynurensäure: 1 mM Kynurensäure in EXS-HEPES
- L-Aspartat: 10 µM in EXS-HEPES
- L-Aspartat-Stock: 10 mM in Aqua dest.
- NiCl: 100 µM Nickel(II)-Chlorid in EXS-HEPES
- NiCl-Stock: 100 mM Nickel(II)-Chlorid x 6 H₂O in Aqua dest.
- NMDA: 20 µM in EXS-HEPES
- NMDA-Stock: 20 mM in Aqua dest.
- TTX: 1 µM Tetrodotoxincitrat in EXS-HEPES
- TTX-Stock: 2mM Tetrodotoxincitrat in Aqua dest.

3 Ergebnisse

3.1 Purkinjezellen im Kleinhirn von NPC1^{-/-}-Mäusen degenerieren progressiv

Sarna et al. (2003) zeigten, dass in NPC1 Aldolase C-negative Purkinjezellen, welche im murinen Kleinhirnwurm in den Lappen I-IX lokalisiert sind, progressiv degenerieren. Da die Geschwindigkeit der Degeneration vom Modell und dessen Haltungsbedingungen abhängt, wurde das Ausmaß der Purkinjezelldegeneration mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen in zwei unterschiedlichen Altersstufen, am postnatalen Tag 22 und 55 (p22 bzw. p55), geprüft. Im verwendeten NPC1-Knockout-Modell BALB/cNctr-Npc1^{m1N}/J zeigte eine Färbung gegen den Purkinjezellmarker Calbindin, dass im Alter von 22 Tagen eine gleichmäßige Verteilung von Calbindin-positiven Purkinjezellen über alle Lappen im Kleinhirnwurm vorliegt (Abb. 12 A, B). Aufnahmen mit einer höheren Vergrößerung zeigten sowohl in NPC1^{+/+}- als auch in NPC1^{-/-}-Mäusen eine lückenfreie Aneinanderreihung von Purkinjezellsomata in den Lappen IV/V (Abb. 12 E, F). Im Alter von 55 Tagen hingegen ist der Verlust von Calbindin-positiven Purkinjezellen in den Lappen I-VIII zu beobachten (Abb. 12 C, D). Im Lappen IV/V von NPC1^{-/-}-Mäusen ist ein Großteil der Purkinjezellsomata verloren gegangen (Abb. 12 G, H). Der Verlust von Calbindin-positiven Purkinjezellen konnte im Western Blot bestätigt werden. In Kleinhirnllysaten von p22 NPC1^{-/-}-Mäusen entsprach die Proteinmenge von Calbindin 89 ± 9 % der Proteinmenge von NPC1^{+/+}-Mäusen (100 ± 7 %; N = 3, n = 3; Abb. 12 I). Bei p55 NPC1^{-/-}-Mäusen war die Calbindinmenge signifikant auf 26 ± 2 % der NPC1^{+/+}-Mäuse (100 ± 9 %) reduziert (N = 8, n = 23-25; Abb. 12 I).

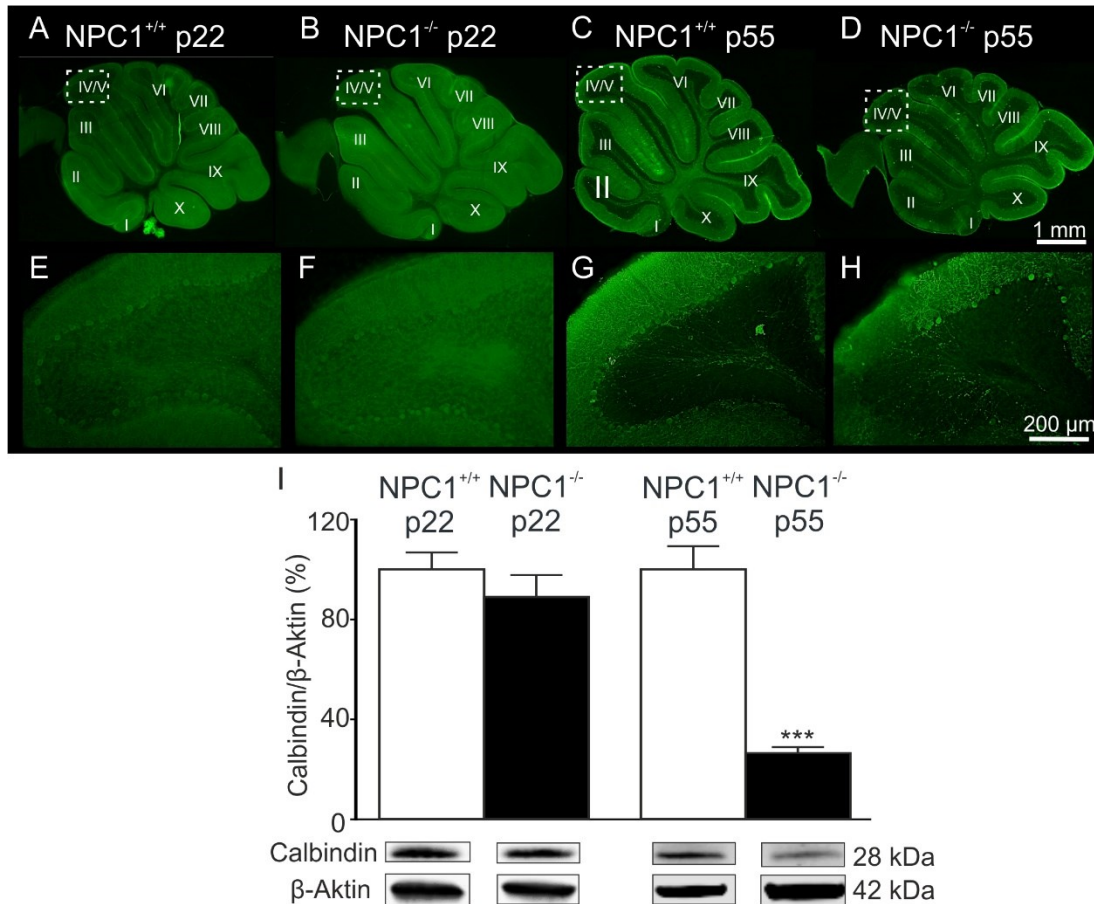


Abb. 12 Purkinjelldegeneration in NPC1^{-/-}-Mäusen.

Eine Calbindin-Färbung von parasagittalen Kleinhirnwurmschnitten zeigte in p22 Mäusen beider Genotypen ein gleichmäßig verteiltes Fluoreszenzsignal über die Lappen. In p55 Mäusen hingegen wurde ein reduziertes Fluoreszenzsignal in den Lappen I-VIII gegenüber den Lappen IX und X von NPC1^{-/-}-Mäusen beobachtet (A-D). Die reduzierte Zahl von Purkinjellsomata in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen war bei einer höheren Vergrößerung von Lappen IV/V zu erkennen (E-H). Die Western Blot Analyse zeigte eine auf 26 % der NPC1^{+/+}-Mäuse signifikant reduzierte Calbindin-Menge in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen, während in p22 Mäusen der Unterschied zwischen den Genotypen nicht signifikant war (I). *** = $p < 0,001$ (ungepaarter, zweiseitiger t-Test). n: p22 NPC1^{+/+} 3; p22 NPC1^{-/-} 3; p55 NPC1^{+/+} 25; p55 NPC1^{-/-} 23.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich p22 NPC1^{-/-}-Mäuse im initialen, und p55 NPC1^{-/-}-Mäuse im fortgeschrittenen Stadium der Purkinjelldegeneration befinden.

Die Ergebnisse der Calbindin-Quantifizierung sind in 9.3 in Tab. 18 detailliert aufgeführt.

3.2 Die Aktionspotentialmuster von Purkinjellen verändern sich in Abhängigkeit der intrazellulären Chloridkonzentration

Purkinjellen generieren intrinsisch Aktionspotentiale. Wird die Aktionspotentialgenerierung gestört, beeinträchtigt dies die Rolle der Purkinjellen in der Motorkoordination und es entwickelt sich eine Ataxie. Um zu prüfen ob die Aktionspotentialgenerierung in NPC1 gestört ist, wurde die Purkinjellaktivität über die Ableitung intrinsisch generierter Aktionspotentiale,

mit Hilfe von Patch-Clamp-Messungen in akuten parasagittalen Schnitten des Kleinhirnwurms, untersucht. Diese Schnittebene erlaubte Messungen an Purkinjezellen aller Lappen, wobei deren Dendritenbaum erhalten blieb. Dies wurde an Zellen beobachtet, die während der elektrophysiologischen Messungen mit Neurobiotin™ gefüllt und anschließend gefärbt wurden (Abb. 13).

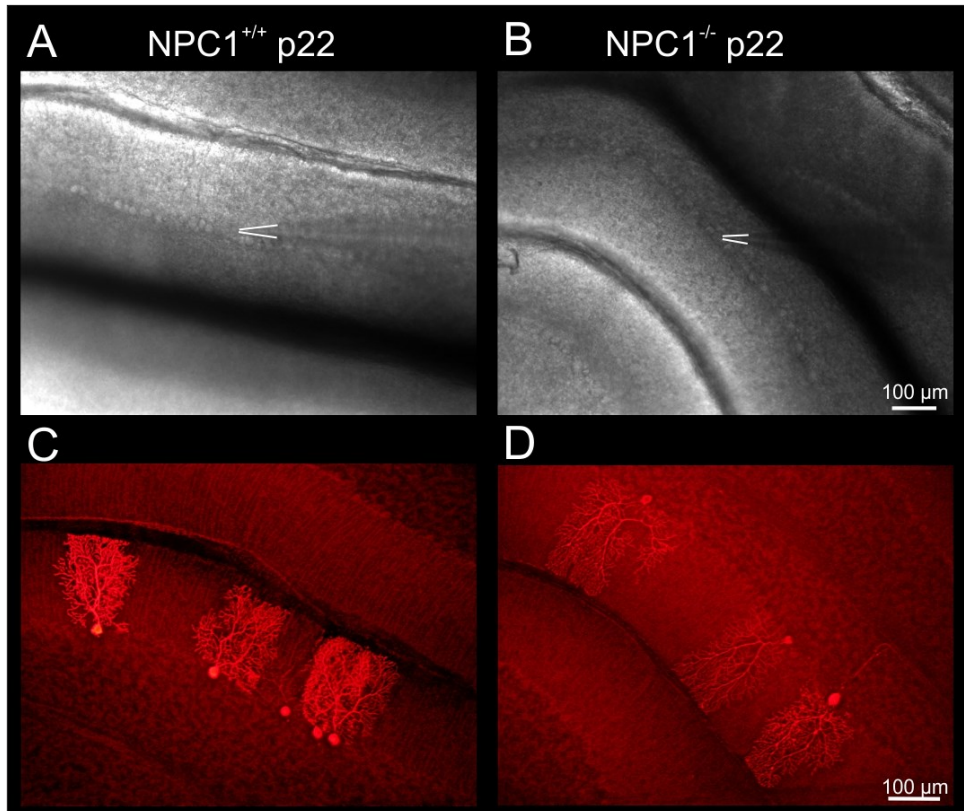


Abb. 13 Intakte Dendritenbäume von Purkinjezellen in parasagittalen Schnitten des Kleinhirnwurms von NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen.

Kleinhirnwurmschnitte mit Patchpipette von NPC1^{+/+}- (Lappen V; A) und NPC1^{-/-}-Mäusen (Lappen IV; B). Eine Färbung des während der Patch-Clamp-Messung in die Zellen eingebrachten Neurobiotins™ zeigte, dass die Dendritenbäume der Purkinjezellen durch die parasagittale Schnittebene erhalten blieb (C, D). Die Kontur der Patchpipette in (A, B) ist weiß hervorgehoben.

Purkinjezellen wurden anhand ihrer Lokalisation in der Purkinjezellschicht und ihres großen Somas optisch identifiziert (Abb. 14 A). Dabei wurden Purkinjezellen in den Lappen III-V ausgewählt, da in NPC1^{-/-}-Mäusen die Purkinjezellen dort degenerieren. Die Aktivität der Purkinjezellen wurde anhand der generierten Aktionspotentiale in Current-Clamp-Messungen bestimmt und in drei Gruppen eingeteilt. Wurden in einem Zeitfenster von fünf Minuten Aktionspotentiale ohne Pause generiert, wurde die Zelle als tonisch feuernd (Tonisch) kategorisiert (Abb. 14 B). Wenn kein Aktionspotential generiert wurde, wurde die Zelle als inaktiv (Inaktiv) bezeichnet. Die dritte Gruppe wurde als Burst bezeichnet und war heterogen

(Abb. 14 C). In diese Gruppe wurden Purkinjezellen aufgenommen in denen sich entweder tonische und inaktive Phasen abwechseln (Bursts; Abb. 14 C, oben) oder die ein trimodales Muster (tonische Phase gefolgt von Bursts und abschließender Inaktivität) bzw. eine Abwandlung davon mit einer zusätzlichen inaktiven Phase zwischen der tonischen und Burst-Phase aufwiesen (Abb. 14 C, Mitte). Auch Purkinjezellen die eine Mischung der anderen Muster zeigten, wurden in diese Gruppe eingeschlossen (Abb. 14 C, unten).

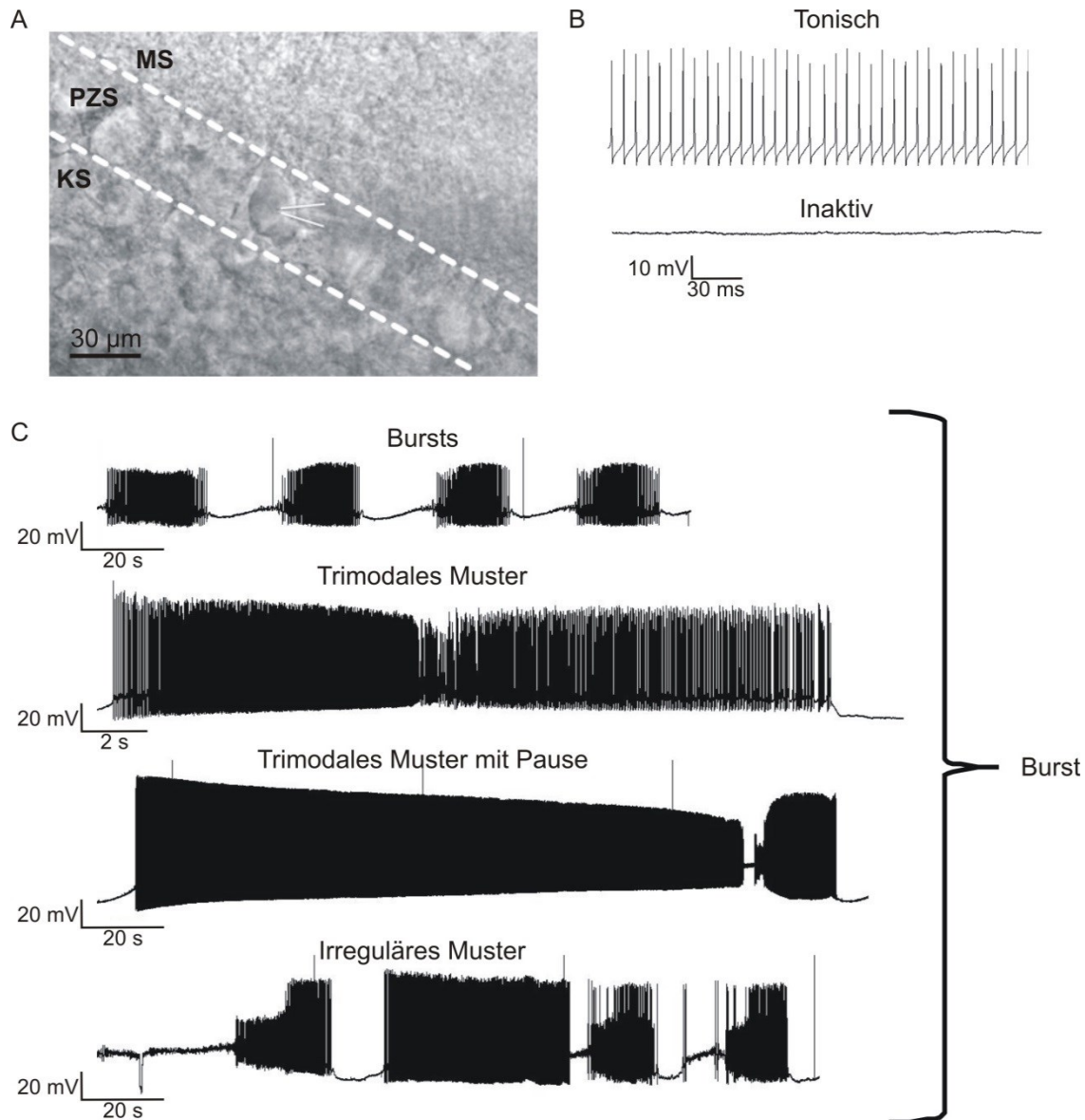


Abb. 14 Purkinjezellen weisen unterschiedliche Aktionspotentialaktivitätsmuster auf.

Patch-Clamp-Messungen von Purkinjezellen in den Lappen III-V (A) zeigten, dass Purkinjezellen Aktionspotentiale in unterschiedlichen Mustern generieren (B, C). Diese Muster wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Während rein tonisch aktive und inaktive Purkinjezellen (B) jeweils eine Gruppe bildeten, wurden Purkinjezellen die Aktionspotentiale in Bursts, trimodalen Mustern oder einer Mischung der genannten Muster generierten als Burst-Gruppe zusammengefasst. MS = Molekularschicht; PZS = Purkinjezellschicht; KS = Körnerzellschicht. Die Kontur der Patchpipette in (A) ist weiß hervorgehoben.

Für die oben beschriebenen Messungen wurde eine Intrazellulärlösung gewählt, deren Chloridkonzentration im physiologischen Bereich lag (physiologische $Cl_{[i]}$). Unter diesen Bedingungen waren keine Unterschiede in der Verteilung der Aktivitätsmuster zu beobachten ($N = 7-8$, $n = 29-30$; Abb. 15 A). 3 % der Purkinjezellen in $NPC1^{+/+}$ - und $NPC1^{-/-}$ -Mäuse waren tonisch aktiv. 83 % der Purkinjezellen der $NPC1^{+/+}$ -Mäuse gehörten der Burst Gruppe an, gegenüber 80 % der $NPC1^{-/-}$ -Mäuse. 14 % der Purkinjezellen der $NPC1^{+/+}$ -Mäuse und 17 % der $NPC1^{-/-}$ -Mäuse waren inaktiv.

In dieser Arbeit wurde vermutet, dass in Kleinhirnen von $NPC1^{-/-}$ -Mäusen die Expression von EAAT reduziert ist. Neben der Funktion als Aminosäuretransporter besitzen EAAT auch noch einen Ionenkanal der für Chlorid leitfähig ist (Fairman et al. 1995). Während Glutamat transportiert wird öffnet dieser Ionenkanal und lässt Chlorid entlang seines elektrochemischen Gradienten fließen (Fairman et al. 1995). Sollte im Speziellen die Expression der Purkinjezell-spezifischen EAAT4 im Kleinhirn von $NPC1^{-/-}$ -Mäusen reduziert sein, könnte die damit einhergehende Reduktion von Chlorid-permeablen Ionenkanälen sich auf die intrinsische Aktivität von Purkinjezellen auswirken.

Unter Verwendung einer Intrazellulärlösung mit einer hohen Chloridkonzentration (Hohe $Cl_{[i]}$) wurden signifikante Unterschiede in der Aktivitätsmustersverteilung zwischen $NPC1^{+/+}$ - und $NPC1^{-/-}$ -Mäusen beobachtet ($N = 15-19$, $n = 43-54$; Abb. 15 B). Signifikant mehr Purkinjezellen in $NPC1^{-/-}$ -Mäusen gegenüber $NPC1^{+/+}$ -Mäusen waren tonisch aktiv (58 % vs. 26 %). Hingegen waren weniger Purkinjezellen in Bursts aktiv (33 % vs. 50 %) oder inaktiv (9 % vs. 24 %).

Ein Vergleich der Aktionspotentialfrequenz und deren Regularität der tonisch aktiven Purkinjezellen erbrachte weitere Unterschiede. Die Analysen zeigten, dass die Aktionspotentialfrequenz in $NPC1^{-/-}$ -Mäusen signifikant reduziert war ($110,4 \pm 8,6$ Hz vs. $142,0 \pm 8,6$ Hz in $NPC1^{+/+}$ -Mäusen; $N = 11-12$, $n = 14-25$; Abb. 15 C). Mit dem Koeffizienten der mittleren Abstände zwischen den Aktionspotentialen (Standardabweichung/Mittelwert der Abstände; KMAA) wurde die Regularität geprüft, was ergab, dass mit einem KMAA von $8,5 \pm 0,9$ % Aktionspotentiale regelmäßiger in $NPC1^{-/-}$ -Mäusen generiert werden (vs. $10,3 \pm 0,6$ % in $NPC1^{+/+}$; $N = 11-12$, $n = 14-25$; Abb. 15 D).

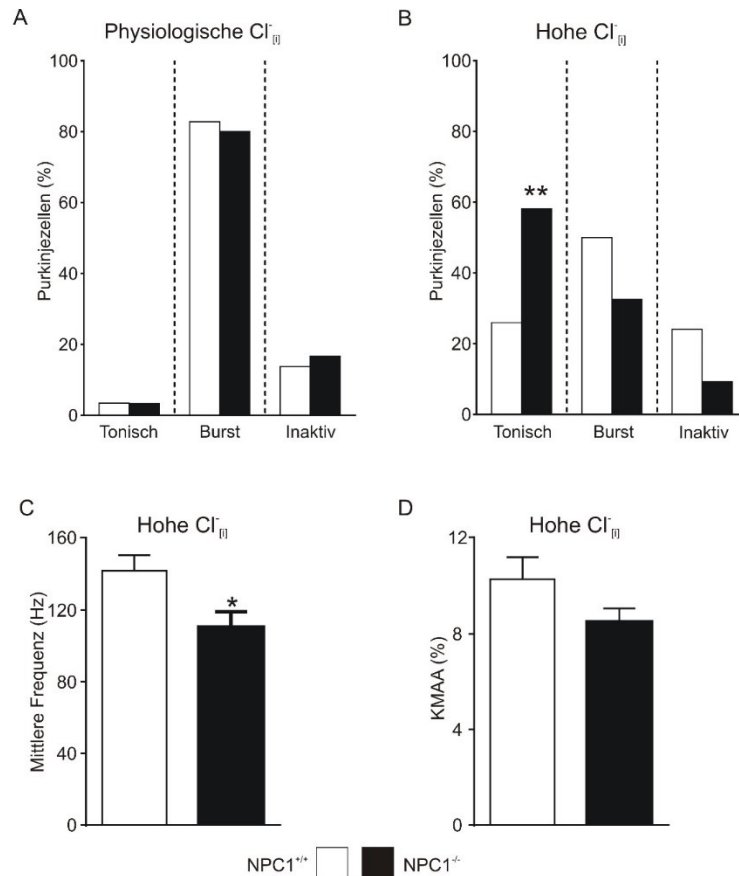


Abb. 15 Chloridabhängige Veränderung der Purkinjellaktivitätsmuster in NPC1^{-/-}-Mäusen.

Bei einer physiologischen $Cl_{[i]}$ waren zwischen NPC1^{+/+}-Mäusen und NPC1^{-/-}-Mäusen keine Unterschiede in der Verteilung der Aktivitätsmuster vorhanden (A). Bei einer hohen $Cl_{[i]}$ waren signifikant mehr Purkinjellen tonisch aktiv in NPC1^{-/-}-Mäusen, während NPC1^{+/+}-Mäuse mehr Burst feuernde und inaktive Purkinjellen aufwiesen (B). Weitere Analysen der tonisch aktiven Purkinjellen von (B) zeigten, dass die Aktionspotentialfrequenz in NPC1^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert war (142 Hz vs. 110 Hz) und die Aktionspotentiale gleichmäßiger generiert wurden (10,3 % vs. 8,5 % Koeffizient der mittleren Aktionspotentialabständen (KMAA); C, D). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ (Barnard's Exact Test (A, B); ungepaarter, zweiseitiger t-Test (C,D)). n: (A) NPC1^{+/+} 29; NPC1^{-/-} 30; (B) NPC1^{+/+} 54; NPC1^{-/-} 43; (C, D) NPC1^{+/+} 14; NPC1^{-/-} 25.

Um den Einfluss der EAAT auf die Purkinjellaktivität weiter zu untersuchen, wurde während der Patch-Clamp-Messungen der EAAT Inhibitor Threo-beta-benzyloxyaspartat (TBOA) in einer Konzentration von 50 μ M appliziert. Bei einem Teil der Purkinjellen führte dies zu einer Veränderung ihres Aktivitätsmusters (Abb. 16 A, Abb. 17). Dabei war, von Wechsel des Aktivitätsmusters (Abb. 17 A, B), über eine Erhöhung der tonischen Frequenz oder Verkürzung der Bursts (Abb. 17 C, E, F), bis hin zu einer Verlängerung der Bursts oder Verlust der Regularität (Abb. 17 D, G), die Art der Veränderung heterogen. Daher wurden die Ergebnisse eingeteilt in auf TBOA-reagierende und nicht-reagierende Purkinjellen.

Während in NPC1^{+/+}-Mäusen 90 % der Purkinjezellen bei einer physiologischen Cl_[i] auf TBOA reagierten, waren es bei einer hohen Cl_[i], mit 48 %, signifikant weniger Zellen (N = 5-7, n = 10-16; Abb. 16 B). Bei den NPC1^{-/-}-Mäusen war der Effekt umgekehrt (Abb. 16 B). Mit 67 % reagierten weniger Purkinjezellen auf TBOA mit einer physiologischen Cl_[i] gegenüber 93 % bei einer hohen Cl_[i] (N = 3-5, n = 12-14).

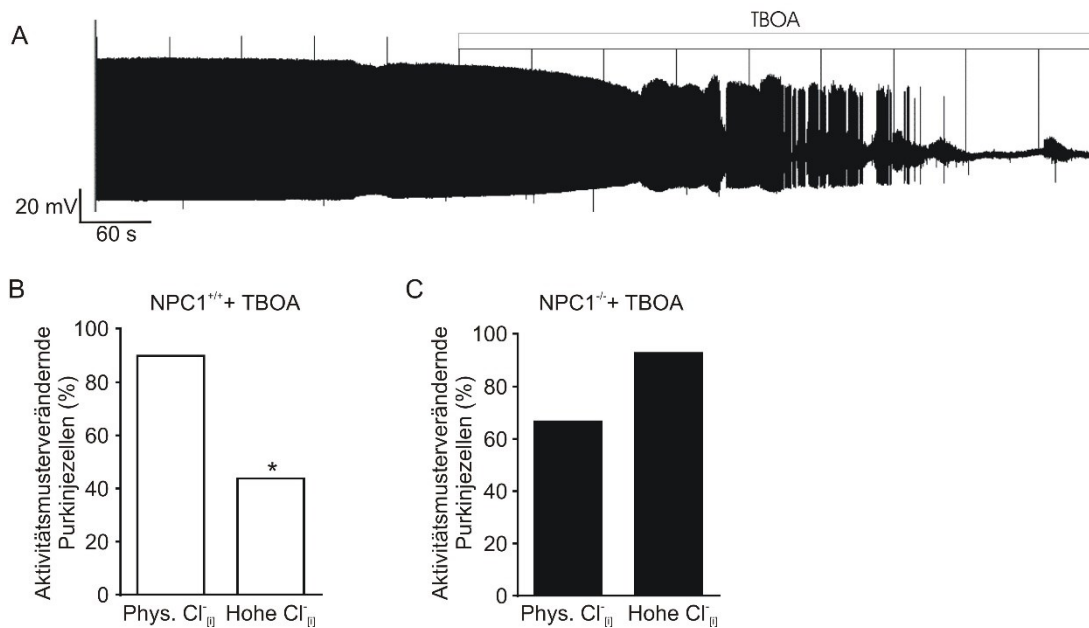


Abb. 16 DL-TBOA-Applikation induzierte Veränderungen im Aktivitätsmuster von Purkinjezellen abhängig vom Genotyp und der intrazellulären Chloridkonzentration.

Der EAAT-Inhibitor DL-TBOA veränderte bei einem Teil der Purkinjezellen das Aktivitätsmuster, hier beispielhaft gezeigt von tonisch zu inaktiv (A). Während in NPC1^{+/+}-Mäusen signifikant weniger Purkinjezellen (44 % vs. 90 %) ihr initiales Aktivitätsmuster bei hoher Cl_[i] gegenüber physiologischer Cl_[i] änderten (B), veränderten mehr Purkinjezellen in NPC1^{-/-}-Mäusen (67 % vs. 93 %) ihr Aktivitätsmuster bei hoher Cl_[i]. * = p < 0,05 (Barnard's Exact Test). n: (B) Phys. Cl_[i] 10; Hohe Cl_[i] 12; (C) Phys. Cl_[i] 16; Hohe Cl_[i] 14;

3 Ergebnisse

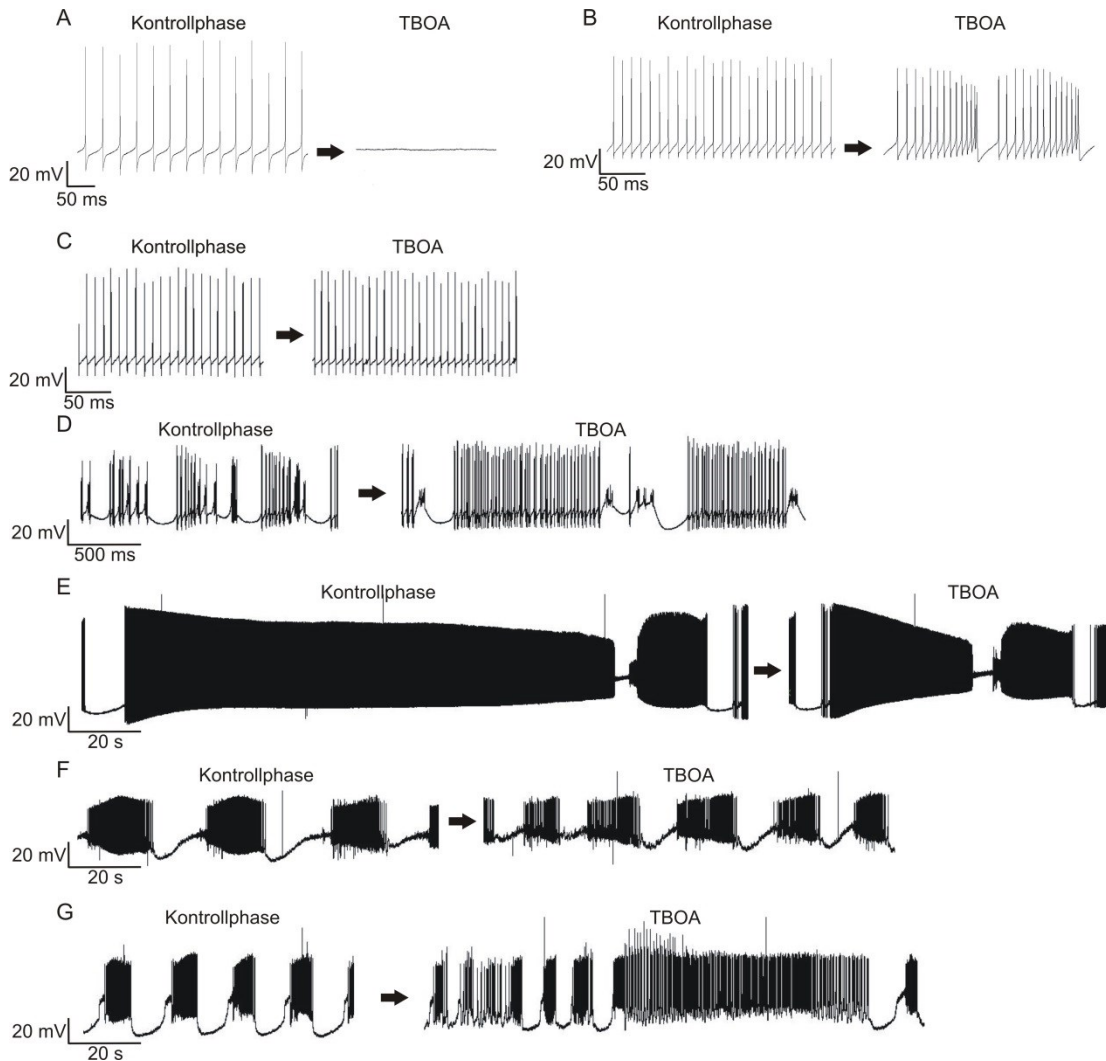


Abb. 17 Unterschiedliche Effekte der Applikation von TBOA auf die Purkinjezellaktivität.

Der EAAT-Inhibitor DL-TBOA veränderte bei einem Teil der Purkinjezellen das Aktivitätsmuster, wobei der Effekt dabei heterogen war. Es traten Musterwechsel von Tonisch zu Inaktiv (A) oder Burst (B) auf. Innerhalb eines Musters traten Effekte wie eine Frequenzerhöhung (C) oder eine Verlängerung von Bursts (D) auf. TBOA konnte trimodale Muster verkürzen (E), die Frequenz von Bursts erhöhen (F) oder auch die Regelmäßigkeit von Bursts stören (G)

Da als Parameter nur die interne Chloridkonzentration zwischen den zwei Messgruppen der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung geändert wurde, wurde vermutet, dass eine veränderte Chloridleitfähigkeit in Purkinjezellen von NPC1^{-/-}-Mäusen vorlag, die zudem sensitiv für eine Inhibition der EAAT war. Dabei war jedoch noch nicht geklärt, ob die veränderte Chloridleitfähigkeit direkt auf der reduzierten EAAT4-Expression oder sekundär durch die extrazelluläre Glutamatakkumulation, ausgelöst durch die reduzierte EAAT-Expression, basiert, welche glutamatgesteuerte Ionenkanäle aktiveren kann.

Die Ergebnisse von 3.2 sind in 9.3 in Tab. 10-13 detailliert aufgeführt.

3.3 Die intrinsische Chloridleitfähigkeit von EAAT4 hat keinen Einfluss auf das Membranpotential von Purkinjezellen

Den Veränderungen der Feuermuster der Aktionspotentiale, wie unter 3.2 beschrieben, könnten Veränderungen des Membranpotentials der Purkinjezellen zu Grunde liegen.

Das Membranpotential wird von der Summe aller Ströme über die Membran einer Zelle bestimmt, wobei das Potential, an dem die Summe aller Ströme null ist, als Gleichgewichtspotential (E_{GG}) bezeichnet wird. Daher tragen auch die Chloridströme der EAAT zum E_{GG} bei.

Um zu prüfen, ob die Chloridleitfähigkeit von EAAT4 an einer veränderten Verteilung der Aktivitätsmuster beteiligt ist, wurde EAAT4 mit dem Agonisten L-Aspartat aktiviert und Veränderungen im Gleichgewichtspotential (E_{GG}) von Purkinjezellen gemessen.

Hierzu wurden Spannungsrampen appliziert und aus den resultierenden Strömen Strom-Spannungskurven erstellt. Hierbei entsprach der Schnittpunkt der Strom-Spannungskurven mit der Abszisse dem Gleichgewichtspotential E_{GG} (Abb. 18). Um den Einfluss der EAAT4 Chloridleitfähigkeit auf E_{GG} zu bestimmen, wurde der potente EAAT4 Agonist L-Aspartat mit einem fokalen Applikationssystem appliziert. Dabei sollte eine Verschiebung von E_{GG} Richtung Chloridumkehrpotential (-62 mV) zu messen sein, wie es z. B. bei einer Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren mit GABA der Fall ist (Abb. 18). Zur Verhinderung einer Aktivierung spannungsgesteuerter Natrium- und Kalziumkanäle, wurden die drei Inhibitoren Tetrodotoxin, Nickel und Cadmium der Extrazellulärlösung zugesetzt. Da L-Aspartat ebenfalls NMDA-Rezeptoren und gegebenenfalls auch nicht-NMDA-Rezeptoren aktiviert, wurden ionotrope Glutamaterezeptoren mit Kynurensäure inhibiert (Brautigam und Eagles 1998).

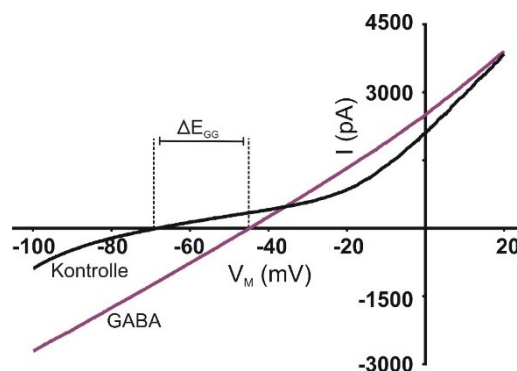


Abb. 18 Verschiebung des Gleichgewichtspotentials durch eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren.

Beispielhaft wird die Verschiebung des Gleichgewichtspotentials durch eine GABA-Applikation gezeigt, welches chloridleitfähige GABA_A-Rezeptoren aktiviert. Vor (Kontrolle) und während der Applikation (GABA) wurden Spannungsrampenprotokolle durchgeführt. Die Applikation von GABA ergab eine positive Verschiebung des Gleichgewichtspotentials von -68 mV zu -45 mV.

Da Purkinjezellen im Lappen X eine höhere EAAT4-Expression aufweisen als in den Lappen III-V, wurden die Messungen in diesem Teil des Kleinhirns durchgeführt. Ein Vergleich von E_{GG} der Kontrollrampe zeigte, dass dieses zwischen NPC1^{+/+}-Mäusen ($-78,9 \pm 1,5$ mV) und NPC1^{-/-}-Mäusen ($-80,6 \pm 2,0$ mV) nicht verschieden war ($N = 4$, $n = 16-18$; Abb. 19 A). Der Extrazellulärlösung hinzugefügtes TBOA beeinflusste E_{GG} nicht (NPC1^{+/+}: $-78,5 \pm 1,7$ mV; NPC1^{-/-}: $-81,7 \pm 2,0$ mV; $N = 4$, $n = 16-18$; Abb. 19 A). Ein Vergleich der mittleren Strom-Spannungskurven zeigte, dass diese von NPC1^{+/+}-Mäusen und NPC1^{-/-}-Mäusen bis ca. -30 mV deckungsgleich sind (Abb. 19 B). Bei positiveren Membranpotentialen wiesen NPC1^{-/-}-Mäuse einen höheren Auswärtsstrom als NPC1^{+/+}-Mäuse auf, was auf einen höheren Einfluss der Chlorid- oder Kaliumleitfähigkeit (Umkehrpotential -102 mV) auf den Summenmembranstrom schließen ließ (Abb. 19 B).

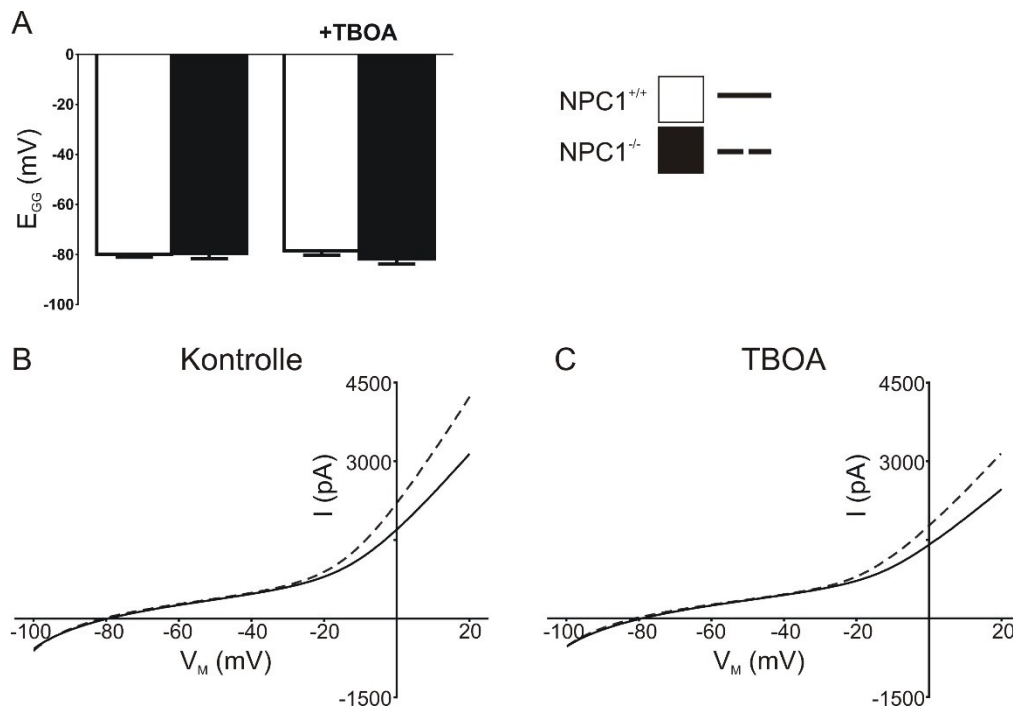


Abb. 19 Kein Unterschied im Gleichgewichtspotential von Purkinjezellen von NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen.

Das Gleichgewichtspotential von Purkinjezellen von NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen wies keine signifikanten Unterschiede, sowohl ohne (-79 mV vs. -81 mV) als auch mit DL-TBOA (-78 mV vs. -82 mV), auf (A). Ein Vergleich der Strom-Spannungskurven zeigte eine Deckungsgleichheit der Verläufe von beiden Genotypen bis ca. -30 mV (B, C). Bei positiveren Potentialen wiesen NPC1^{-/-}-Mäuse einen höheren Auswärtsstrom als NPC1^{+/+}-Mäuse auf. n : (A-C) NPC1^{+/+} 18; NPC1^{-/-} 16.

Eine Aktivierung von EAAT4 mittels L-Aspartat zeigte bei NPC1^{+/+}-Mäusen keinen Einfluss auf E_{GG} (Verschiebung um $0,03 \pm 0,14$ mV; $N = 4$, $n = 17$), was sich auch in Anwesenheit von TBOA nicht änderte (Verschiebung um $-0,04 \pm 0,21$ mV; $N = 4$, $n = 18$; Abb. 20 A). Bei

NPC1^{-/-}-Mäusen wurde E_{GG} durch L-Aspartat signifikant negativer und verschob sich damit vom Chloridumkehrpotential weg ($-0,68 \pm 0,26$ mV; N = 4, n = 18; Abb. 20 A). TBOA reduzierte diese Verschiebung auf $-0,34 \pm 0,13$ mV, was ebenfalls signifikant zu E_{GG} der Kontrollrampe war (N = 4, n = 15; Abb. 20 A). Übereinandergelegt waren die mittleren Strom-Spannungskurven der Kontrollrampe und der Spannungsrampe während der L-Aspartat-Applikation nicht unterscheidbar (Abb. 20 B-E).

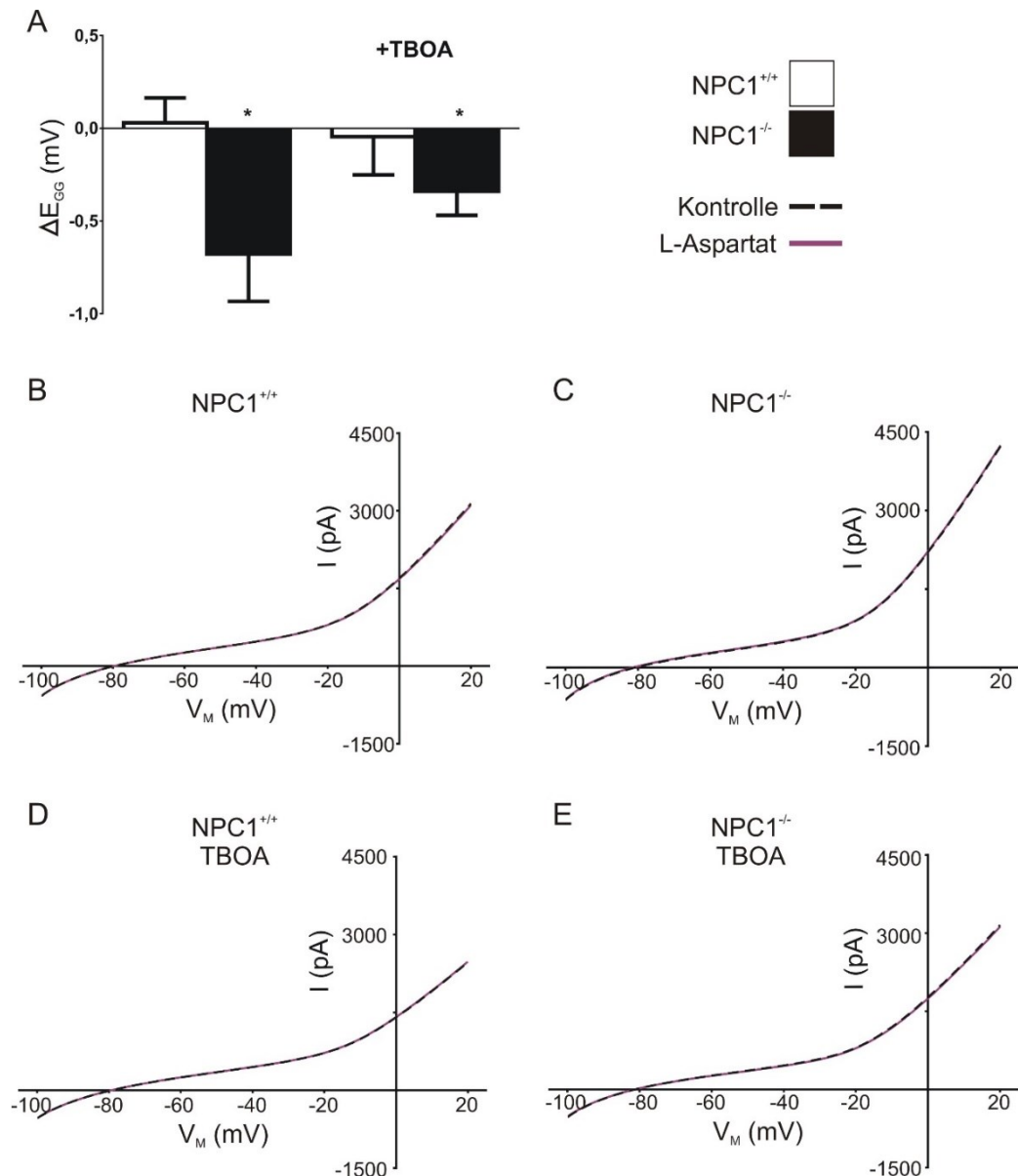


Abb. 20 Auswirkung von L-Aspartat auf das Gleichgewichtspotential.

Aktivierung von EAAT mit L-Aspartat hat keinen Einfluss auf das Gleichgewichtspotential von Purkinjezellen von NPC1^{+/+}-Mäusen. Bei NPC1^{-/-}-Mäusen verschiebt L-Aspartat das Gleichgewichtspotential signifikant zu negativeren Werten ($-0,68$ mV bzw. TBOA: $-0,34$ mV) im Vergleich zur Kontrollrampe (A). Übereinandergelegt sind die mittleren Strom-Spannungskurven der Kontrollphasen deckungsgleich mit denen der L-Aspartat-Applikation (B-E). * = $p < 0,05$ (gepaarter, zweiseitiger t-Test). n: (A-E) NPC1^{+/+} 17; NPC1^{-/-} 18; TBOA NPC1^{+/+} 18; TBOA NPC1^{-/-} 15.

Unerwartet war, dass keine Verschiebung von E_{GG} in $NPC1^{+/+}$ -Mäusen gemessen wurde. Da EAAT4 im Dendritenbaum der Purkinjezellen exprimiert ist, sind möglicherweise die dort stattfindenden Membranpotentialverschiebungen zu gering, als dass diese in $NPC1^{+/+}$ -Mäusen mit einer am Zellsoma lokalisierten Patchpipette gemessen werden können. Diese technische Limitation wird als Space-Clamp-Problem bezeichnet (Molleman 2005). In $NPC1^{-/-}$ -Mäusen könnte das Space-Clamp-Problem durch eine Degeneration des Dendritenbaumes kleiner als in den $NPC1^{+/+}$ -Mäusen gewesen sein, weswegen die induzierten Verschiebungen von E_{GG} messbar waren.

Die Ergebnisse von 3.3 sind in 9.3 in Tab. 13 und 15 detailliert aufgeführt.

3.4 Die Expression von Glutamattransportern im Kleinhirn von $NPC1^{-/-}$ -Mäusen ist reduziert

Die EAAT-Inhibition durch TBOA hatte in $NPC1^{-/-}$ -Mäusen und $NPC1^{+/+}$ -Mäusen unterschiedliche Effekte auf die intrinsische Aktivität der Purkinjezellen. Dies könnte auf einer veränderten Expression der EAAT basieren. Daher wurde im Western Blot die Expression von EAAT1, 2 und 4 in Kleinhirnlysaten von p55 Mäusen analysiert. Da zudem zytoskelettale Veränderungen in NPC1 beschrieben wurden, wurde β III Spektrin, das in SCA5 mutiert ist, ebenfalls in die Analyse aufgenommen (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a; Perkins et al. 2016a).

In p55 $NPC1^{-/-}$ -Mäusen war die Expression aller untersuchten EAAT signifikant gegenüber den $NPC1^{+/+}$ -Mäusen reduziert. Die EAAT4-Expression lag auf $82 \pm 4 \%$ des $NPC1^{+/+}$ -Levels ($100 \pm 4 \%$; N = 8, n = 23-25; Abb. 21 A), die von EAAT1 auf $64 \pm 4 \%$ (vs. $100 \pm 1 \%$; N = 8, n = 8-10; Abb. 21 C) und die von EAAT2 auf $42 \pm 7 \%$ (vs. $100 \pm 12 \%$; N = 8, n = 13-16; Abb. 21 D). Die Expression von β III Spektrin war ebenfalls signifikant niedriger in $NPC1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu $NPC1^{+/+}$ -Mäusen ($45 \pm 4 \%$ vs. $100 \pm 4 \%$; N = 8, n = 23-25; Abb. 21 B).

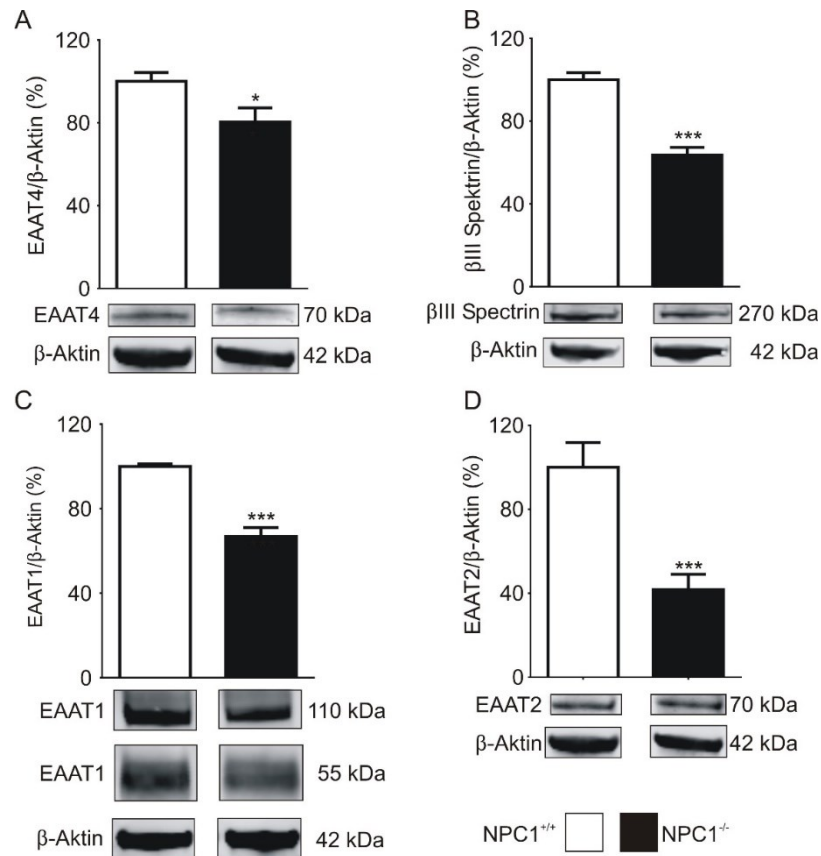


Abb. 21 Reduzierte Expression von Glutamattransportern in NPC1^{-/-}-Mäusen.

Western Blot Analysen zeigten ein signifikant reduziertes Proteinsignal der Glutamattransporter EAAT4 (82 % NPC1^{+/+}; A), EAAT1 (64 % NPC1^{+/+}; C) und EAAT2 (42 % NPC1^{+/+}; D) in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen. Zusätzlich war die Expression des EAAT4 stabilisierenden, zytoskelettalen Proteins βIII Spektrin signifikant reduziert (45 % NPC1^{+/+}; B). Für (C) wurden die Signalintensitäten der 55 kDa und 110 kDa Banden von EAAT1 summiert. * = p < 0,05; *** = p < 0,001 (ungepaarter, zweiseitiger t-Test). n: (A, B) NPC1^{+/+} 25; NPC1^{-/-} 23; (C) NPC1^{+/+} 10; NPC1^{-/-} 8; (D) NPC1^{+/+} 16; NPC1^{-/-} 13.

Die Western Blot Ergebnisse zeigten somit, dass die EAAT in NPC1^{-/-}-Mäusen geringer exprimiert werden, was die funktionellen Ergebnisse der EAAT-Inhibition aus 3.2 unterstützt. Die Ergebnisse von 3.4 sind in 9.3 in Tab. 18 detailliert aufgeführt.

3.5 Die GABAerge synaptische Transmission ist verändert in Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen

Neben der reduzierten EAAT4-Expression, können Veränderungen der GABAergen synaptischen Transmission eine weitere mögliche Ursache für die in NPC1^{-/-}-Mäusen beobachteten chloridabhängigen Effekte auf die Aktivitätsmuster sein. Purkinjellen erhalten GABAerge synaptische Eingänge von Korb- und Sternzellen (Interneurone), welche durch eine Freisetzung von GABA die GABA_A-Rezeptoren der Purkinjellen aktivieren und damit einen Chloridstrom initiieren (Huppelsberg und Walter 2005). Die Frequenz der GABA-Freisetzung

kann hierbei über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf den Interneuronen gesteigert werden (Rudolph et al. 2016; Liu und Lachamp 2006). Daher wurden die Frequenz der GABAergen, inhibitorischen, postsynaptischen Ströme (IPSC) und der Einfluss einer NMDA-Applikation auf die IPSC-Frequenz untersucht. Aufgrund des bereits angesprochenen Space-Clamp-Problems (siehe 3.3) waren Voltage-Clamp-Messungen jedoch nicht an Purkinjezellen von p45-p56 Mäusen möglich und wurden an Purkinjezellen der Lappen III-V von p19-p25 Mäusen durchgeführt. Die mittlere PSC-Frequenz wurde aus fünf Minuten der Messungen ohne Applikation berechnet (Abb. 22 A, B). Danach erfolgte eine fünfminütige fokale Applikation von EXS-HEPES mit anschließender dreiminütiger NMDA-Applikation und abschließendem Ausspülen mit EXS-HEPES (Abb. 22 A, C, D). Beim Auftragen der Frequenz über die Zeit zeigte sich, dass NMDA eine PSC-Frequenzerhöhung induziert, die nach Beendigung der Applikation wieder abklang (Abb. 22 A, C, D). Eine Koapplikation des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Gabazin zeigte, dass der Großteil der gemessenen postsynaptischen Ströme (post synaptic current, PSC) GABAerger Natur waren und somit inhibitorische PSC (IPSC) waren (Abb. 22 A, E). In Anwesenheit von Gabazin erfolgte keine PSC-Frequenzerhöhung durch NMDA, was zeigte, dass dieser Effekt auf einer Steigerung der GABAergen synaptischen Transmission beruhte (Abb. 22 A, F).

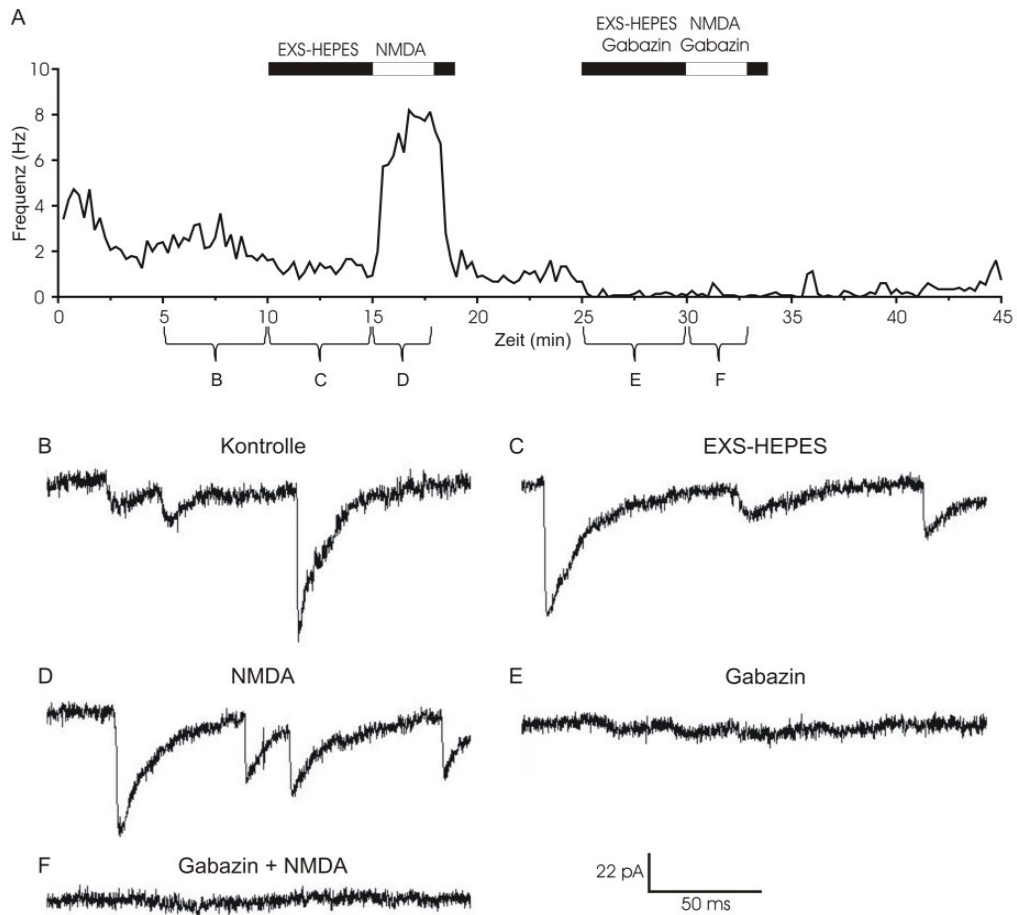


Abb. 22 Messung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC).

In einem Frequenz-Zeit-Graphen zeigte sich der reversible IPSC-frequenzerhöhende Effekt von NMDA (A). B-F zeigen repräsentative Stromspuren aus der Messung (A). Die Kontrollphase (B) wurde zur Berechnung der mittleren Frequenz genutzt, die von der EXS-HEPES-Applikation nicht verändert wurde (C). NMDA erhöhte temporär die IPSC-Frequenz (D). Gabazin inhibierte die gemessenen PSCs (E, F). Dies zeigte, dass es sich um GABA_A-Rezeptor vermittelte Ströme handelte und dass die NMDA-induzierte erhöhte PSC-Frequenz auf einer vermehrten Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren basierte.

Ein Vergleich der Kontrollphasen ergab, dass die IPSC-Frequenz in NPC1^{-/-}-Mäusen mit $5,8 \pm 1,0$ Hz höher ist als in NPC1^{+/+}-Mäusen ($3,4 \pm 0,6$ Hz; N = 7-11, n = 17-25; Abb. 23). Appliziertes NMDA dahingegen erhöhte in signifikant weniger Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen (22 %) die IPSC-Frequenz (vs. 73 % in NPC1^{+/+}; N = 6-10, n = 15-27; Abb. 24 A). Bei den Purkinjellen in NPC1^{-/-}-Mäusen, die die Frequenz steigerten, war die Frequenzsteigerung gegenüber NPC1^{+/+}-Mäusen reduziert ($2,1 \pm 0,2$ fache Frequenzerhöhung vs. $4,2 \pm 0,8$ fache in NPC1^{+/+}; N = 4-5, n = 4-8; Abb. 24 B-D).

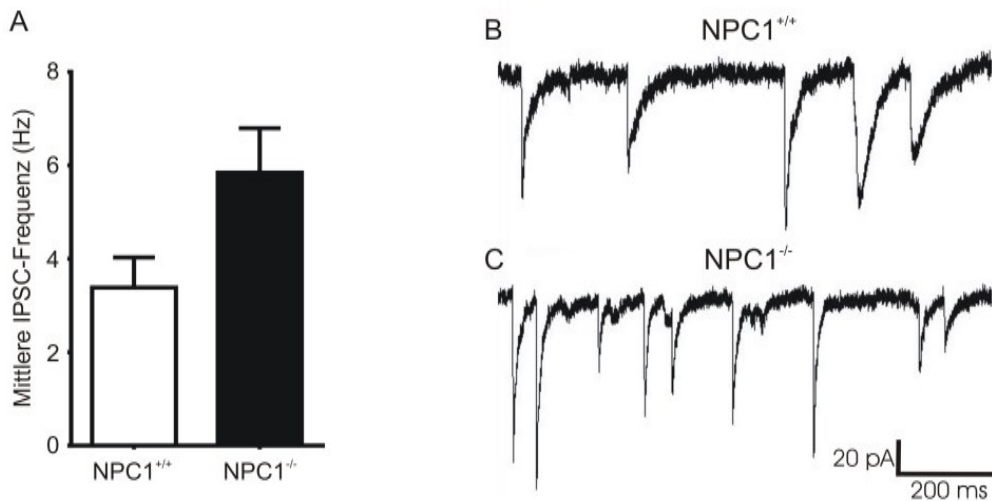


Abb. 23 Erhöhte IPSC-Frequenz in Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen.

Die mittlere IPSC-Frequenz war in NPC1^{-/-}-Mäusen erhöht (5,8 Hz vs. 3,4 Hz; A). Repräsentative Ströme sind in B und C dargestellt. n: (A) NPC1^{+/+} 17; NPC1^{-/-} 25.

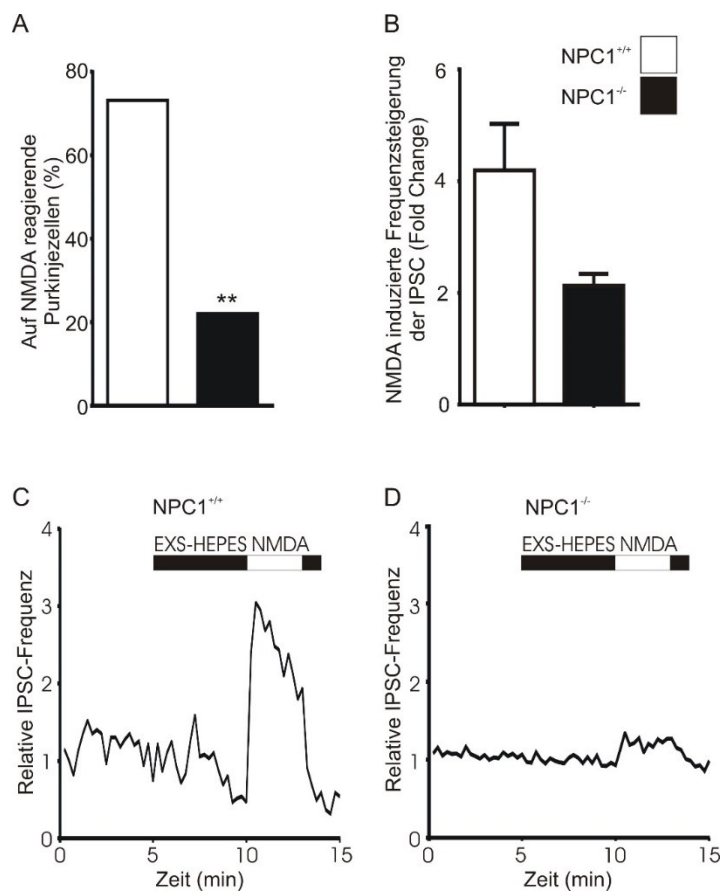


Abb. 24 Der Effekt von NMDA ist in Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen reduziert.

In signifikant weniger Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen erhöhte NMDA die IPSC-Frequenz (22 % vs. 73 %; A). In den reagierenden Purkinjellen von NPC1^{-/-}-Mäusen war das Ausmaß der Frequenzerhöhung gegenüber der NPC1^{+/+}-Mäusen reduziert (2,1-fach vs. 4,2-fach; B). C und D zeigen repräsentative Frequenz-Zeit-Verläufe von NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen. ** = $p < 0,01$ (Barnard's Exact Test). n: (A) NPC1^{+/+} 15; NPC1^{-/-} 27; (B) NPC1^{+/+} 8; NPC1^{-/-} 4.

Zusammengefasst war in NPC1^{-/-}-Mäusen die basale IPSC-Frequenz erhöht und NMDA konnte diese nur eingeschränkt steigern. In NPC1 wurden Störungen der synaptischen Plastizität in verschiedenen Hirnarealen beschrieben (D'Arcangelo et al. 2011; Avshalumov et al. 2012; Sun et al. 2011). Dies könnte ursächlich für die gemessenen Veränderungen sein, da die IPSC-Frequenzsteigerung durch NMDA auf einer Potenzierung glutamaterger Synapsen der Interneurone basiert, was deren Freisetzung von GABA erhöht (Rudolph et al. 2016; Liu und Lachamp 2006). Im nächsten Schritt wurde daher die Expression und Phosphorylierung von der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluA2 betrachtet, welche in der synaptischen Plastizität eine zentrale Rolle einnimmt (Liu und Zukin 2007).

Die Ergebnisse von 3.5 sind in 9.3 in Tab. 15-18 detailliert aufgeführt.

3.6 Die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluA2 ist hypophosphoryliert im Kleinhirn von NPC1^{-/-}-Mäusen

AMPA-Rezeptoren spielen eine maßgebliche Funktion in der Modulation von synaptischer Transmission. Deren Funktion wird wiederum durch verschiedenste Prozesse reguliert. Eine Möglichkeit besteht im Austausch von AMPA-Rezeptoren mit verschiedenen Untereinheiten in der Synapse. So werden z. B. AMPA-Rezeptoren, die keine GluA2-Untereinheit aufweisen, gegen GluA2-positive Rezeptoren ausgetauscht (Hastie und Henley 2009; Henley und Wilkinson 2016). Dies kann durch laterale Diffusion und/oder endozytotische Prozesse stattfinden, die unter anderem durch die Proteinkinase C reguliert werden (Hastie und Henley 2009; Henley und Wilkinson 2016). Im Zusammenhang mit NPC1 wurde, z. B. in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine Aktivierung der PKC pathophysiologische Merkmale von NPC1 abmildert (Peter et al. 2017a). Daher war zu vermuten, dass dem in den NPC1^{-/-}-Mäusen eingeschränktem Effekt auf die Frequenz der IPSC, eine Störung in der Regulation, Expression oder Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren zu Grunde liegt. Daher war es Ziel die Expression von GluA2 und deren Phosphorylierung zu untersuchen.

Zunächst wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierten Serine (P-Ser) in der PKC-Zielsequenz (R/K)X(S*)(Hyd)(R/K) im Western Blot eingesetzt, wodurch eine Vielzahl von PKC-Substraten detektiert wurde und die generelle PKC-Aktivität abgeschätzt werden konnte. Da der Antikörper mehrere Proteine erfasste, wurde der Bereich zwischen der obersten klaren Bande bis zum β -Aktinsignal als P-Ser-PKC-Substrat quantifiziert (Abb. 25 A). In Kleinhirnlysaten von p22 NPC1^{-/-}-Mäusen war das Signal der P-Ser-PKC-Substrate leicht reduziert ($87 \pm 8\%$ vs. $100 \pm 2\%$ in NPC1^{+/+}; N = 3, n = 6; Abb. 25 B). Entgegen der

Erwartung lag in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen mit 132 ± 11 % des NPC1^{+/+}-Wertes (100 ± 8 %) eine signifikante Hyperphosphorylierung der PKC-Substrate vor (N = 3, n = 6; Abb. 25 B).

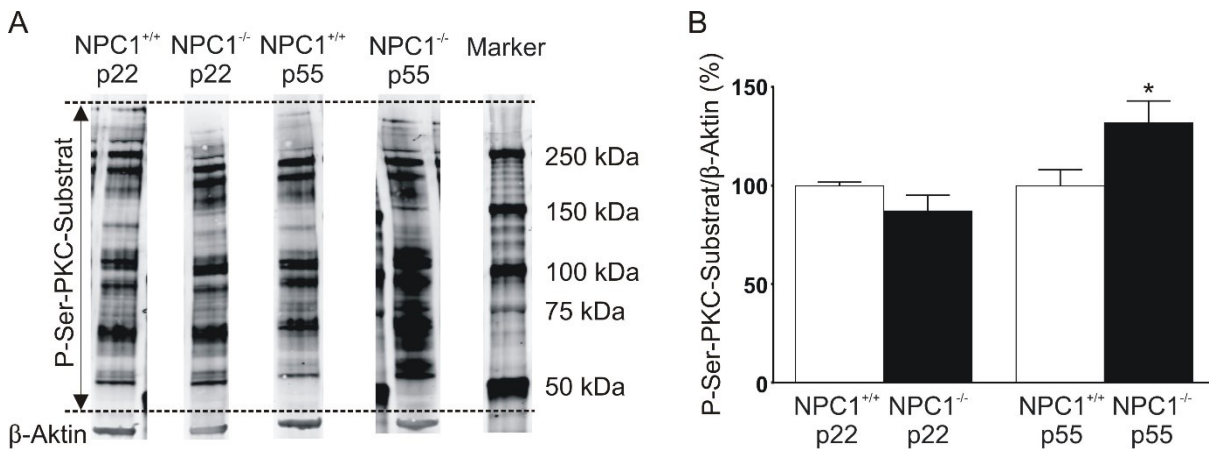


Abb. 25 PKC abhängige Hyperphosphorylierung in p55 NPC^{-/-}-Mäusen.

Ein Antikörper gegen phosphorylierte Serine in einer PKC Zielsequenz von Proteinen wurde eingesetzt, um die PKC-Aktivität abzuschätzen (A). Das Fluoreszenzsignal im Bereich zwischen der ersten Bande bis zur β -Aktinbande wurde hierfür quantifiziert. Während in Kleinhirnen von p22 NPC1^{-/-}-Mäusen eine Hypophosphorylierung (87 % NPC1^{+/+}) vorlag, waren in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen die PKC Zielproteine hyperphosphoryliert (132 % NPC1^{+/+}; B). * = $p < 0,05$ (ungepaarter, zweiseitiger t-Test). n: (B) NPC1^{+/+} 6; NPC1^{-/-} 6.

Diese Ergebnisse ließen jedoch noch nicht auf die Oberflächenexpression GluA2-positiver AMPA-Rezeptoren schließen. Sowohl der Einbau als auch die Internalisierung dieser AMPA-Rezeptoren werden über die PKC vermittelt. Phosphoryliert die PKC das Protein PICK1, führt dies zu einem Einbau GluA2-positiver AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran der Parallelfaser-Sternzellsynapse (Liu und Cull-Candy 2005). Umgekehrt sorgt die Phosphorylierung der GluA2-Untereinheit an Ser880 für die Internalisierung der AMPA-Rezeptoren (Matsuda et al. 1999; Matsuda et al. 2000; Chung et al. 2000). Um zu prüfen, ob diese Balance gestört ist, wurde sowohl die Gesamtexpression von GluA2 als auch von an Ser880-phosphoryliertem GluA2 (P-Ser880-GluA2) im Western Blot untersucht. In Kleinhirnllysaten von p22 Mäusen war die Gesamtmenge an GluA2 zwischen NPC1^{+/+}-Mäusen (100 ± 9 %) und NPC1^{-/-}-Mäusen (107 ± 8 %) nicht signifikant unterschiedlich (N = 3, n = 6; Abb. 26 A). In p55 Mäusen dagegen war die Gesamtmenge an GluA2 in NPC1^{-/-}-Mäusen (85 ± 5 %) signifikant niedriger gegenüber NPC1^{+/+}-Mäusen (100 ± 3 %; N = 3, n = 6; Abb. 26 A). Zur Überprüfung der PKC-abhängigen Phosphorylierung, wurde ein Antikörper gegen P-Ser880-GluA2 gewählt. Die Analysen zeigten, dass in p22 NPC1^{-/-}-Mäusen mit 75 ± 5 % die Menge an P-Ser880-GluA2 signifikant niedriger war gegenüber NPC1^{+/+}-Mäusen (100 ± 2 %;

N = 3, n = 6; Abb. 26 B). Diese Hypophosphorylierung war auch in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen vorhanden (57 ± 8 % vs. 100 ± 1 % in NPC1^{+/+}; N = 3, n = 6; Abb. 26 B). Dabei blieb das Verhältnis von P-Ser880-GluA2 zu GluA2 mit 70 % in p22 und 67 % in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen gleich (Abb. 26 B).

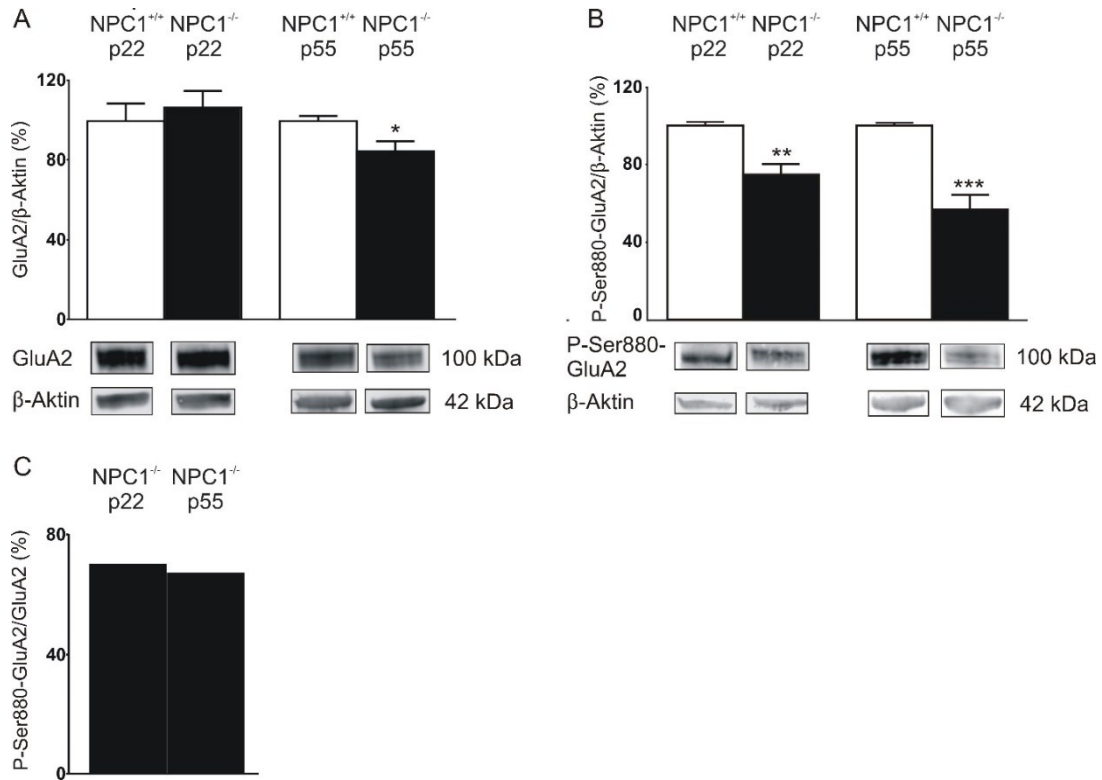


Abb. 26 Reduzierte Expression von Ser880-phosphorylierten GluA2 in NPC1^{-/-}-Mäusen.

Während in Kleinhirnen von p22 Mäusen die GluA2-Expression zwischen den Genotypen gleich war, zeigte sich eine signifikant reduzierte Menge an GluA2 in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen (85 % NPC1^{+/+}; A). Sowohl bei p22 als auch bei p55 Mäusen war die Menge an Ser880-phosphoryliertem GluA2 signifikant reduziert (75 % bzw. 57 % NPC1^{+/+}; B). Das Verhältnis von Ser880-phosphorylierten GluA2 zu GluA2 war in den beiden Altersstufen p22 zu p55 NPC1^{-/-}-Mäusen nicht unterschiedlich (70 % bzw. 67 %; C). * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001 (ungepaarter, zweiseitiger t-Test). n: (A, B) NPC1^{+/+} 6; NPC1^{-/-} 6.

Da eine Ser880-Phosphorylierung die Internalisierung von GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren induziert, ist dies ein Indiz dafür, dass vermehrt GluA2-positive AMPA-Rezeptoren in der Membran lokalisiert sind (Isaac et al. 2007). Auf die PKC-Funktion bezogen widerspricht sich jedoch die Hypophosphorylierung von GluA2 mit der Hyperphosphorylierung die der P-Ser-PKC-Substrat-Antikörper zeigte. Eine mögliche Erklärung ist, dass die PKC nicht in allen Zellkompartimenten oder Signalkaskaden eine reduzierte Aktivität aufweist, sondern in bestimmten Zellkompartimenten sogar hyperaktiv ist. Die Ergebnisse von 3.6 sind in 9.3 in Tab. 18 und Tab. 19 detailliert aufgeführt.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, funktionelle Veränderungen von zerebellären Purkinjezellen in einem NPC1-Mausmodell im Vergleich zu Wildtypmäusen zu charakterisieren. Dabei wurde zum einen die intrinsische Aktivität der Purkinjezellen, sowie der Einfluss von EAAT auf diese, untersucht. Zum anderen wurde die inhibitorische synaptische Transmission auf ihre Frequenz und Regulation analysiert. Zuletzt wurde die Expression von GluA2 sowie deren PKC-phosphorylierte Form, P-Ser880-GluA2, und die Gesamtmenge an PKC-phosphorylierten Proteinen ermittelt. Diese Untersuchungen dienten dazu ein weitergehendes Verständnis der pathophysiologischen Prozesse, welche zur Purkinjezelldegeneration beitragen, zu erlangen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

3.7.1 Untersuchungen zur Funktion und Expression der EAAT

- Mittels Patch-Clamp-Messungen wurden die Feuermuster der spontan generierten Aktionspotentiale von Purkinjezellen untersucht. Anhand dieser Untersuchungen wurden die Zellen in die drei folgenden Kategorien spontaner Aktivität unterteilt: Tonisch (anhaltende, gleichmäßige Feuerrate), Burst (verschiedene Feuermuster die durch Aktivitätspausen gekennzeichnet waren) und Inaktiv (es war keine Spontanaktivität messbar).
- Die Erhöhung der intrazellulären Cl^- -Konzentration veränderte die Aktivitätsmustersverteilung der Purkinjezellen von NPC1^{-/-}-Mäusen zu NPC1^{+/+}-Mäusen signifikant.
- Die Inhibition der EAAT durch TBOA veränderte die Aktivitätsmuster, wobei in Abhängigkeit der verwendeten intrazellulären Chloridkonzentration die Effekte in NPC1^{+/+}-Mäusen und NPC1^{-/-}-Mäusen in der Tendenz gegensätzlich verliefen.
- Messungen des basalen Gleichgewichtspotentials mittels Spannungsrampen zeigten keine Unterschiede zwischen NPC1^{+/+}-Mäusen und NPC1^{-/-}-Mäusen.
- In NPC1^{-/-}-Mäusen hatte die Aktivierung der EAAT durch L-Aspartat eine Verschiebung des Gleichgewichtspotentials zur Folge. Diese Verschiebung wurde durch die gleichzeitige Applikation von TBOA reduziert.
- In NPC1^{+/+}-Mäusen führte sowohl die L-Aspartat, als auch die L-Aspartat/TBOA-Applikation zu keiner Verschiebung des Gleichgewichtspotentials der induzierten Ströme.
- In Kleinhirnllysaten von NPC1^{-/-}-Mäusen (p55) wurde eine signifikant niedrigere Expression von EAAT1, 2 und 4 beobachtet, sowie von β III Spektrin, welches als Ankerprotein von EAAT4 fungiert.

3.7.2 Untersuchungen zur inhibitorischen synaptischen Transmission

- Mittels Patch-Clamp-Messungen wurden an Purkinjezellen inhibitorische postsynaptische Ströme gemessen.
- Purkinjezellen von NPC1^{-/-}-Mäusen zeigten gegenüber der Kontrolle eine erhöhte IPSC-Frequenz.
- Die Applikation von NMDA induzierte in NPC1^{-/-}-Mäusen, in einem signifikant geringeren Anteil von Purkinjezellen, eine Erhöhung der IPSC-Frequenz. Diese fiel zudem weniger stark aus.

3.7.3 Untersuchungen zu Expression und zum Phosphorylierungsstatus von GluA2

- NPC1^{-/-}-Mäuse zeigten, in Abhängigkeit des Alters, unterschiedliche Mengen an PKC-phosphorylierten Proteinen. In p22 NPC1^{-/-}-Mäusen war eine geringere, in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen eine signifikant höhere Menge an PKC-phosphorylierten Proteinen im Kleinhirn, gegenüber den Kontrollen, vorhanden.
- In p22 NPC1^{-/-}-Mäusen war eine gleiche, in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen eine signifikant geringere Menge an GluA2 gegenüber der Kontrollen vorhanden.
- Die Menge an Ser880-phosphoryliertem GluA2 war in beiden Altersstufen in NPC1^{-/-}-Mäusen signifikant gegenüber NPC1^{+/+}-Mäusen reduziert.

4 Diskussion

Die Purkinjezelldegeneration ist ein herausstechender Teil der Pathophysiologie des Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1; Tang et al. 2010). Dabei ist derzeit die Verbindung zwischen Mutation und Neurodegeneration noch offen. Eine Lücke, die auch für andere Erkrankungen mit Purkinjezelldegeneration, wie hereditäre Ataxien, noch nicht geschlossen ist (Paulson 2009; Perkins et al. 2016a; Kasumu und Bezprozvanny 2012). Dabei sind die zugrunde liegenden Gendefekte in den verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sehr unterschiedlich, wie am Beispiel der spinocerebellären Ataxien zu erkennen ist. Unter anderem sind Mutationen in Transkriptionsfaktoren (SCA1-3; 7-10), Kalziumkanälen (SCA6 und 42), dem zytoskelettalen Protein β III Spektrin (SCA5) oder der PKC γ (SCA14) bekannt (Bird 1993). Während sich die verschiedenen SCA hinsichtlich der betroffenen Hirnareale unterscheiden, ist ihnen das Symptom der zerebellären Ataxie und die Purkinjezelldegeneration gemein (Paulson 2009; Tada et al. 2015). Daher liegt es nahe, dass es Überschneidungen der pathophysiologischen Mechanismen der Purkinjezelldegeneration gibt. Im Falle der SCA wurden mutationsabhängig verschiedene Hypothesen zur Purkinjezelldegeneration aufgestellt. Bei Verlängerungen von Trinukleotidsequenzen (z. B. SCA1, 2, 8) akkumulieren die Transkripte oder Proteine und könnten neurotoxisch wirken (Huang und Verbeek 2018). Mutationen in Ionenkanälen oder Transportern könnten die Kalziumhomöostase und die synaptische Transmission stören, wie z. B. in SCA5, 6 oder 13 (Huang und Verbeek 2018; Perkins et al. 2010). Bezüglich NPC1 könnte eine veränderte Regulation der exzitatorischen synaptischen Transmission zur Exzitotoxizität führen (Sun et al. 2011). Ebenso wird diskutiert, dass Störungen im Transport oder der Funktion von Mitochondrien und ein damit verbundener Energiemangel im Dendritenbaum der Purkinjezelle, ebenfalls zur Degeneration führen (Huang und Verbeek 2018; López-Doménech et al. 2016).

Daher war es unter anderem Ziel dieser Arbeit Veränderungen der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung und Glutamattransporterexpression zu untersuchen, um Gemeinsamkeiten von pathophysiologischen Veränderungen von Purkinjezellen in NPC1 und anderen neurodegenerativen Erkrankungen festzustellen. Zudem wurde untersucht, ob neben den beschriebenen Veränderungen der exzitatorischen synaptischen Transmission zu Purkinjezellen, auch Veränderungen in der inhibitorischen Transmission zu finden sind

4.1 Die intrinsische Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen ist chloridabhängig verändert in NPC1^{-/-}-Mäusen

Purkinjezellen generieren intrinsisch Aktionspotentiale, was über synaptische Eingänge moduliert wird. Dadurch wird die Inhibition von Neuronen der Kleinhirnerne moduliert (Shakkottai et al. 2011; Walter et al. 2006). Störungen in der Aktionspotentialgenerierung beeinträchtigen die Motorkoordination, was symptomatisch als Ataxie erkennbar ist (Shakkottai et al. 2011; Walter et al. 2006). Dabei unterscheiden sich innerhalb der Familie der zerebellären Ataxien die Veränderungen der intrinsischen Aktivität der Purkinjezellen. Zum einen wurden Veränderungen der Aktivitätsmuster (Tonisch, Burst, Inaktiv) beschrieben. In Mausmodellen von SCA2, 3 und 27 wurden vermehrt Purkinjezellen gefunden, welche Aktionspotentiale in Bursts generierten oder inaktiv waren, während die Kontrolltiere hauptsächlich tonisch aktive Purkinjezellen aufwiesen (Shakkottai et al. 2009; Shakkottai et al. 2011; Kasumu et al. 2012b). Zum anderen sind Veränderungen in Aktionspotentialfrequenzen oder Aktionspotentialregularität bekannt. In SCA1, 2 und 5 ist die Aktionspotentialfrequenz reduziert, in SCA3 erhöht und in SCA2, sowie in der episodischen Ataxie Typ 2 werden Aktionspotentiale unregelmäßiger generiert (Perkins et al. 2010; Shakkottai et al. 2011; Walter et al. 2006; Hourez et al. 2011; Kasumu et al. 2012b). In NPC1-defizienten Mäusen wurden in der vorliegenden Arbeit Veränderungen der Aktivitätsmuster in Abhängigkeit der intrazellulären Chloridkonzentration gefunden. Bei einer physiologischen intrazellulären Chloridkonzentration wurden in 80 % der NPC1-defizienten Mäuse und Kontrollmäuse Burst-generierende Purkinjezellen gefunden. Dass hauptsächlich Burst-generierende Purkinjezellen in Kontrollmäusen gefunden wurden, während die Kontrollen in der Literatur weitestgehend tonisch aktive Purkinjezellen aufwiesen, könnte an den Unterschieden der experimentellen Konfiguration liegen. In der vorliegenden Studie wurden die Aktionspotentiale in der Whole-Cell-Konfiguration gemessen, während Kasumu et al. (2012b) extrazellulär gemessen haben und dadurch die Zusammensetzungen des Zytoplasmas der Purkinjezellen nicht geändert haben. Shakkottai et al. (2011) nutzten ebenfalls die Whole-Cell-Konfiguration, verwendeten aber eine andere Intrazellulärlösung, was Einfluss auf die Ionengradienten und Ionenkanalregulation hat. Ein weiterer Faktor ist die Messtemperatur, welche die Umkehrpotentiale der Ionen beeinflusst (Tab. 9). In dieser Studie wurden wie bei Kasumu et al. (2012b) die Aktionspotentiale bei über 30 °C aufgezeichnet, während die Messungen in SCA3 und 27 bei Raumtemperatur erfolgten (Shakkottai et al. 2009; Shakkottai et al. 2011). Diese Unterschiede erschweren den direkten Vergleich der Daten zwischen den verschiedenen

Studien, weswegen die Unterschiede zwischen den Aktivitätsmustern der Experimentgruppen innerhalb der Studien relevanter sind. Die sich nicht unterscheidende Aktivitätsmustersverteilung zwischen NPC1-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen bei einer physiologischen Chloridkonzentration muss auch nicht der *in vivo* Situation entsprechen. Purkinjezellen generieren Aktionspotentiale zwar intrinsisch, jedoch werden diese über synaptische Eingänge moduliert (Engbers et al. 2013; Hurlock et al. 2008). Sowohl die Kletterfasern als auch die Moosfasern, welche die Körnerzellen stimulieren, entspringen Hirnarealen außerhalb des Kleinhirns (Lehmann-Horn 2011). Da diese Fasern während der Präparation der Kleinhirnschnitte durchtrennt wurden, müsste die Aktivität der exzitatorischen Komponenten des Netzwerkes der Kleinhirnrinde reduziert sein. Daher könnten *in vivo* Messungen ergeben, dass mit intaktem Netzwerk die Aktionspotentialgenerierung in NPC1-defizienten Mäusen doch unterschiedlich ist. Nichtsdestotrotz scheint die intrinsische Komponente der Aktionspotentialgenerierung nicht beeinträchtigt zu sein.

Unterschiede in den Aktivitätsmustern zwischen NPC1-defizienten und Kontrollmäusen konnten in dieser Arbeit jedoch über eine Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration induziert werden. Dieser Ansatz basierte auf dem Verdacht, dass eine reduzierte zerebelläre Expression der Glutamattransporter EAAT in NPC1-defizienten Mäusen vorliegt, wie er in SCA1, 5 und 7 beschrieben wurde (Custer et al. 2006; Cvetanovic 2015; Lin et al. 2000; Perkins et al. 2010; Serra et al. 2004). Byun et al. (2006) fanden reduzierte mRNA-Level von EAAT3 im Hippokampus von NPC1-defizienten Mäusen und Caporali et al. (2016) eine reduzierte zerebelläre EAAT1-Expression in 15 Tage alten *Npc1^{nmfl⁶⁴}*-Mäusen. Die Erkenntnisse in SCA5 verbinden zudem die Expression von EAAT und zytoskelettale Veränderungen, da mit β III Spektrin ein zytoskelettales Protein mutiert ist, welches im Mausmodell primär die EAAT4-Expression und in der Progression der Erkrankung sekundär die EAAT1-Expression reduziert (Perkins et al. 2010). Daher könnten die in humanen NPC1-mutierten Zellen beschriebenen Veränderungen im Zytoskelett auch die EAAT-Expression beeinflussen (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Da EAAT auch glutamatgesteuerte Chloridkanäle sind, könnten bei einer veränderten EAAT4-Expression in Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen die Aktivitätsmuster, durch den veränderten Chloridstrom, unterschiedlich zu den Kontrollmäusen verteilt sein (Fairman et al. 1995). Tatsächlich wurden signifikant mehr tonisch aktive Zellen in NPC1-defizienten Mäusen gefunden, während die Kontrollmäuse mehr Burst-generierende und inaktive Purkinjezellen aufwiesen. Die gefundene Aktivitätsmustersverteilung könnte darauf basieren, dass bei der hohen intrazellulären

Chloridkonzentration das Umkehrpotential von Chlorid bei 2 mV lag, und damit positiver als das Ruhepotential der Purkinjezellen war. Dadurch depolarisieren Chloridströme die Zelle, wodurch das Membranpotential in Richtung der Aktivierungsschwelle der spannungsgesteuerten Natriumkanäle verschoben wird. Im Falle der Kontrollmäuse überschreitet es diese jedoch länger oder dauerhaft, wodurch die spannungsgesteuerten Natriumkanäle nach der Aktivierung in einem inaktivierten Zustand verbleiben. Durch die geringere EAAT4-Expression und die hieraus resultierende geringere Chloridleitfähigkeit, könnte die Depolarisation in NPC1-defizienten Mäusen geringer ausfallen, wodurch mehr tonisch aktive Purkinjezellen zu beobachten wären. Was ebenfalls für eine reduzierte Depolarisation durch Chlorid in NPC1-defizienten Mäusen spricht, ist die signifikant reduzierte Aktionspotentialfrequenz tonisch aktiver Purkinjezellen unter diesen Bedingungen. Bis es zum Depolarisationsblock kommt, erhöht ein gesteigertes Membranpotential die generierte Aktionspotentialfrequenz (Fakler und Jonas 2011). Die höhere Depolarisation durch Chlorid in Kontrollmäusen könnte daher die geringere Zahl an tonisch aktiven Zellen, die aber eine höhere Aktionspotentialfrequenz aufweisen, erklären. Dadurch würde sich die Ursache der reduzierten Aktionspotentialfrequenz in NPC1-defizienten Mäusen von denen in SCA5 (reduzierte Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen) und SCA2 (erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration durch eine gesteigerte Aktivierung der Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptoren) unterscheiden (Perkins et al. 2010; Kasumu et al. 2012b). Interessanterweise sind die gemessenen Aktionspotentialfrequenzen der Kontrollmäuse dieser Arbeit mit 142 Hz deutlich höher als die beschriebenen in SCA2 (etwa 50 Hz) und SCA5 (43,4 Hz), wobei diese Unterschiede ebenfalls auf den bereits beschriebenen unterschiedlichen experimentellen Konfigurationen beruhen könnten (Perkins et al. 2010; Kasumu et al. 2012b).

4.2 Die Aktivität der EAAT beeinflusst die intrinsische Aktionspotentialgenerierung

Um den Einfluss der EAAT auf die intrinsische Spontanaktivität der Purkinjezellen weiter zu bestimmen, wurden in einem Teil der Messungen die EAAT mit TBOA inhibiert. Dies induzierte, bei physiologischer intrazellulärer Chloridkonzentration, in 90 % der Kontroll- und in 67 % der NPC1-defizienten Mäusen ein Wechsel des initialen Aktivitätsmusters. Während Yuan et al. (2007) in extrazellulären Aufnahmen eine leichte Erhöhung der basalen Aktionspotentialfrequenz in Purkinjezellen durch TBOA beschrieben, wurden in dieser Arbeit mit Veränderung der tonischen Aktionspotentialfrequenz, erhöhten Burstraten und Wechsels der Aktivitätsmuster, vielfältige Effekte auf die intrinsische Aktivität gefunden. Dadurch gab

es jedoch nur eine geringe Zahl gleichartiger Veränderungen, weswegen diese als „auf TBOA reagierend“ zusammengefasst wurden. Dass weniger Purkinjezellen in NPC1-defizienten Mäusen durch TBOA ihr Aktivitätsmuster ändern, könnte auf der reduzierten Expression der EAAT basieren, welche im Western Blot detektiert wurde. Die Aktivität der Purkinjezelle wird durch die Summe aller Ionenströme bestimmt. Wenn die EAAT-Expression reduziert ist, würden die von ihnen abhängigen Leitfähigkeiten auch einen geringeren Anteil am Summenstrom ausmachen. Dadurch wäre ihr Einfluss auf den Summenstrom geringer und eine Inhibition der EAAT würde den Summenstrom und damit die Aktivität der Purkinjezellen weniger beeinflussen. Unter Verwendung einer Intrazellulärlösung mit hoher Chloridkonzentration verändern wiederum mehr Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen ihr Aktivitätsmuster durch TBOA als in den Experimenten mit physiologischer Chloridkonzentration. Die veränderten Chloridströme könnten die Purkinjezellaktivität soweit destabilisieren, dass die Inhibition der EAAT in diesem Fall ausreicht, um zu Veränderungen der Aktionspotentialgenerierung zu führen. Bei den Kontrolltieren könnte dabei die umgekehrte Situation auftreten und das initiale Aktivitätsmuster stabilisieren.

Was an dieser Stelle noch offen ist, ist welche Ionenleitfähigkeiten durch eine EAAT-Inhibition Veränderungen in den Aktivitätsmustern der Purkinjezellen bewirken.

Eine Möglichkeit basiert darauf, dass EAAT als Glutamattransporter die Aufgabe haben die glutamaterge synaptische Transmission zu beenden (Tzingounis und Wadiche 2007). Werden diese inhibiert, werden die Glutamatrezeptoren der postsynaptischen Zelle länger aktiviert (Tzingounis und Wadiche 2007). Gleichzeitig könnte die Lokalisation der EAAT eine Rolle spielen. So könnte z. B. die perisynaptische EAAT4-Expression der Purkinjezellen die Aktivität der mGluR1 oder die EAAT1-Expression die Aktivität von NMDA-Rezeptoren von Interneuronen modulieren, indem sie eben das Glutamat aus den Synapsen bzw. deren Umgebung entfernen und eine Akkumulation von Glutamat verhindern (Su und Shen 2009; Chrobak und Soltys 2017). Eine längere Applikation eines TBOA-Derivats erhöhte in CA1-Pyramidenzellen die Aktionspotentialfrequenz (Tsukada et al. 2005). Dieser Effekt konnte durch die Inhibition von NMDA- oder AMPA-Rezeptoren gestoppt werden, was dafür spricht, dass dieser auf der Akkumulation von Glutamat basiert (Tsukada et al. 2005). In Purkinjezellen wurde beschrieben, dass eine TBOA-Applikation die LTD der Kletterfaser-Purkinjezellsynapsen verstärkt (Su und Shen 2009). Zudem verändert sich die GABAerge synaptische Transmission zu Purkinjezellen durch eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren der präsynaptischen Interneurone. (Huang und Bordey 2004). Eine

Inhibition der zerebellären EAAT könnte somit den Summenmembranstrom, und damit das Aktivitätsmuster der Purkinjezellen, über eine gesteigerte Aktivierung der glutamatergen und GABAergen synaptischen Transmission, letztere indirekt über die Aktivierung von Interneuronen, verändern.

Um zu beurteilen, ob TBOA die Netzwerkaktivität verändert, wären Messungen der postsynaptischen Ströme der Purkinjezellen erforderlich. Dies ist jedoch in p45-56 Mäusen kaum möglich. Durch den komplexen Dendritenbaum der Purkinjezellen dieses Alters, können Voltage-Clamp-Aufnahmen der synaptischen Transmission nicht artefaktfrei durchgeführt werden. Diese Limitation wird Space-Clamp-Problem genannt und basiert darauf, dass durch den elektrischen Widerstand des Zytoplasmas, das am Soma angelegte Haltepotential nicht den gesamten Dendritenbaum durchdringt (Spruston und Johnston 2008). Dadurch ist in den Dendriten das Membranpotential nicht kontrollierbar und spannungsgesteuerte Ionenkanäle können sich öffnen (Spruston und Johnston 2008). Die Ströme der spannungsgesteuerten Ionenkanäle würden dann die postsynaptischen Ströme überlagern. Umgekehrt können synaptische Ströme durch den Widerstand des Dendritenbaumes herausgefiltert werden, wodurch sich Amplitude und Kinetik der somatisch gemessenen postsynaptischen Ströme verändern (Spruston und Johnston 2008).

Ein anderer Ansatz, den funktionellen Einfluss der veränderten EAAT-Expression zu erfassen, zielte auf die Ionenpore der EAAT ab. EAAT besitzen eine Ionenpore die permeabel für Chlorid ist und sich während des Transportes von Glutamat öffnet (Fairman et al. 1995). Die biologische Bedeutung dieser Chloridpore ist nicht abschließend geklärt, jedoch wird vermutet, dass deren Chloridstrom ein Gegengewicht zum elektrogenen Aminosäuretransport (zwei positive Ladungen pro transportierten Glutamat oder Aspartat werden Netto in die Zelle transportiert) darstellt und damit einer transportbedingten Depolarisation der Zellen entgegenwirkt (Divito und Underhill 2014; Takayasu et al. 2009). Aber sie beeinflusst auch die synaptische Transmission und spielt während der Entwicklung von Bergmanngliazellen eine Rolle im intrazellulären Chloridhaushalt (Veruki et al. 2006; Untiet et al. 2016). Dabei ist bei Purkinjezellen der Chloridstrom durch EAAT4 relevant. Die zerebelläre EAAT4-Expression in NPC1-defizienten Mäusen war zwar signifikant reduziert, lag aber weiterhin bei 82 % gegenüber der Expression in Kontrollmäusen. Dadurch ist die relative Expression weiterhin höher als die von EAAT1 (64 % der Kontrolle) und EAAT2 (47 % der Kontrolle). Was jedoch zu berücksichtigen ist, ist, dass die Expression von β III Spektrin in NPC1-defizienten Mäusen um 55% gegenüber der Kontrolle reduziert war. Da β III Spektrin die Oberflächenexpression

von EAAT4 stabilisiert, könnte dessen Verlust zu einer reduzierten Translokation der EAAT4 führen (Perkins et al. 2010). Durch die fehlende Lokalisation von EAAT4 an der Zelloberfläche, könnte, selbst bei normaler EAAT4-Proteinmenge, dieses nicht seine biologische Funktion ausüben. Um die funktionellen Auswirkungen der reduzierten EAAT4-Expression in NPC1-defizienten Mäusen zu erfassen, wurden daher Spannungsrampenexperimente durchgeführt. Dabei wurde das Potential ermittelt, an dem der Summenmembranstrom null ist, das Gleichgewichtspotential. EAAT4 wurde durch L-Aspartat aktiviert, was einen zusätzlichen Chloridstrom in den Membranstrom einbringt und das Gleichgewichtspotential Richtung Chloridumkehrpotential verschieben sollte, was in diesen Experimenten bei 2 mV lag. Durch die Inhibition der Glutamatrezeptoren durch Kynurensäure, wurden dabei mögliche synaptischen Effekte durch die Glutamatakkumulation blockiert. Überraschenderweise zeigten die Purkinjezellen der NPC1-defizienten Mäuse eine signifikant größere Verschiebung des Gleichgewichtspotentials durch L-Aspartat, welches sich jedoch vom Chloridumkehrpotential entfernte. Eine Koapplikation mit TBOA reduzierte die L-Aspartat induzierte Gleichgewichtspotentialverschiebung, was ein Hinweis darauf ist, dass dieser Effekt durch EAAT vermittelt wird. Die Verschiebungen des Gleichgewichtspotential durch L-Aspartat in NPC1-defizienten Mäusen um -0,7 mV und durch die Koapplikation um -0,3 mV wirken gering, jedoch muss berücksichtigt werden, dass diese am Purkinjezellsoma gemessen wurden. Durch die perisynaptische Lage von EAAT4 im großen Dendritenbaum der Purkinjezellen, wurden die induzierten Ströme möglicherweise durch das Space-Clamp-Problem herausgefiltert und reduziert (Spruston und Johnston 2008). Daher könnten die Verschiebungen in den Dendriten größer gewesen sein und hätten damit durchaus biologische Relevanz.

Allgemein wurde eine größere Verschiebung des Gleichgewichtspotentials bei den Kontrollmäusen gegenüber den NPC1-defizienten Mäusen erwartet. Gegenteilig wurde keine Verschiebung des Gleichgewichtspotentials gemessen, obwohl diese Experimente an Purkinjezellen aus Lappen X durchgeführt wurden, welche eine hohe EAAT4-Expression aufweisen (Dehnes et al. 1998; Gincel et al. 2007; Zhou et al. 2014). Dieser Unterschied zwischen NPC1-defizienten Mäusen und den Kontrollen könnte auf einer Degeneration der Dendritenbäume der Purkinjezellen basieren.

EAAT4 wird physiologisch in den Mikrodomänen der dreiteiligen Synapsen in den Purkinjezellendriten exprimiert (Takayasu et al. 2009; Chrobak und Soltys 2017). In NPC1-defizienten Mäusen reduziert sich womöglich durch die Degeneration der Dendriten das Space-Clamp-Problem. Alternativ könnte auch eine veränderte Lokalisation von EAAT4

vorhanden sein. EAAT4 wird in NPC1-defizienten Mäusen möglicherweise nicht perisynaptisch, sondern in anderen Bereichen der Zellmembran, und damit näher am Soma, exprimiert. Dies könnte dabei auch durch den Verlust seines Ankerproteins β III Spektrin bedingt sein.

In beiden Fällen ist es daher vorstellbar, dass in NPC1-defizienten Mäusen die durch die L-Aspartat-Applikation induzierten Ströme weiterhin messbar waren, während diese in den Kontrollmäusen durch das Space-Clamp-Problem vollständig herausgefiltert wurden (Spruston und Johnston 2008). Um diese Vermutung zu prüfen könnten Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, inwieweit die Dendritenbäume in NPC1-defizienten Mäusen degeneriert sind und ob EAAT4 perisynaptisch exprimiert wird.

Trotz der offenen Fragen bezüglich des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus, konnte mittels des EAAT Antagonisten DL-TBOA bestätigt werden, dass die EAAT-Aktivität die Aktivität von Purkinjezellen beeinflusst (Huang und Bordey 2004; Yuan et al. 2007; Perkins et al. 2018). Dieser Einfluss unterschied sich dabei zwischen NPC1-defizienten und Kontrollmäusen, was ein Hinweis darauf ist, dass die reduzierte EAAT-Expression in NPC1-defizienten Mäusen zur Ataxie beitragen könnte.

4.3 Die reduzierte zerebelläre EAAT-Expression könnte zur Purkinjezelldegeneration in NPC1^{-/-}-Mäusen beitragen

Ein Verlust der EAAT kann nicht nur die Funktion von Purkinjezellen stören, sondern auch deren Degeneration induzieren. Die reduzierte EAAT-Expression könnte die glutamaterge synaptische Transmission zu Purkinjezellen durch eine eingeschränkte Wiederaufnahme von Glutamat aus dem Extrazellularraum verlängern (Tzingounis und Wadiche 2007). Dies könnte den Kalziumeinstrom durch die Glutamatrezeptoren verlängern und damit die Kalziumhomöostase stören (Brorson et al. 1994). Diese gestörte Kalziumhomöostase kann zur Degeneration der Purkinjezellen führen, ein Prozess der als Exzitotoxizität oder auch Dark-Cell-Degeneration bezeichnet wird und auch in Mausmodellen von SCA2 und SCA5 beschrieben wurde (Garthwaite und Garthwaite 1991a; Garthwaite und Garthwaite 1991b; Perkins et al. 2010; Kasumu et al. 2012b). Die letztere Bezeichnung basiert darauf, dass das Zytoplasma und der Zellkern von geschädigten Purkinjezellen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, im Vergleich zu nicht geschädigten Zellen, dunkler erscheint (Garthwaite und Garthwaite 1991a).

In dieser Arbeit wurde eine reduzierte zerebelläre Expression der EAAT in 55 Tage alten NPC1-defizienten Mäusen gefunden. Dies ist ebenfalls für mehrere SCA beschrieben und stellt

ein gemeinsames pathophysiologisches Merkmal dar. Eine reduzierte Expression von EAAT1 wurde auch in SCA1, 5 und 7, sowie eine reduzierte Expression von EAAT4 und β III Spektrin in SCA1 und 5 beschrieben (Custer et al. 2006; Cvetanovic 2015; Lin et al. 2000; Perkins et al. 2010; Serra et al. 2004). Darüber hinaus lag in NPC1-defizienten Mäusen eine reduzierte EAAT2-Expression auf 42 % der Kontrolle vor. In Immunfluoreszenzfärbungen konnte ein Verlust der Purkinjezellen in Lappen I-VIII des Kleinhirnwurms beobachtet werden. Die Kombination aus reduzierter EAAT1-Expression und Verlust von Purkinjezellen im anterioren Bereich des Kleinhirnwurms ähnelt der Situation in Mäusen mit einem EAAT1-Knockout, wie eine kürzlich erschienene Studie zeigt, in der die Auswirkung von EAAT1- und EAAT4-Knockouts auf die Purkinjezelldegeneration untersucht wurde (Perkins et al. 2018). Dabei ist zu beachten, dass im Kleinhirnwurm die Purkinjezellen in den posterioren Lappen verstärkt Aldolase C (Zebirin II) exprimieren (Zhou et al. 2014; Sarna et al. 2003). Diese Purkinjezellen degenerieren nur im geringen Umfang in NPC1 (Sarna et al. 2003). Dagegen befinden sich im anterioren Bereich hauptsächlich Aldolase C-negative Purkinjezellen, welche in NPC1 degenerieren (Sarna et al. 2003). Ein Knockout von EAAT1 und EAAT4 wirkt sich unterschiedlich auf Aldolase C-positive und negative Purkinjezellen aus. Ein EAAT1-Knockout führt zu Degeneration und Dysfunktion der Aldolase C-negativen Purkinjezellen, während Aldolase C-positive Purkinjezellen nicht betroffen sind (Perkins et al. 2018). Im Falle des EAAT4-Knockouts ist es wiederum umgekehrt (Perkins et al. 2018). Durch die Parallelen im Degenerationsmuster ist zu vermuten, dass besonders der Verlust von EAAT1 die Purkinjezellen in NPC1-defizienten Mäusen degenerieren lässt. EAAT1 wird zerebellär in Bergmanngliazellen und nicht in Purkinjezellen exprimiert, was darauf hinweist, dass die NPC1-Defizienz in diesen Gliazellen ein wichtiger Faktor in der Purkinjezelldegeneration sein könnte. Dem entgegen stehen jedoch Studien in Mausmodellen, in denen NPC1 spezifisch in Purkinjezellen ausgeknockt wurde (Ko et al. 2005; Elrick et al. 2010). Diese Studien zeigten, dass eine NPC1-Defizienz spezifisch in Purkinjezellen ausreichend ist um eine Purkinjezelldegeneration zu induzieren. Dies schließt jedoch eine Beteiligung der Bergmanngliazellen an der Purkinjezelldegeneration nicht aus, wie am Beispiel eines Mausmodells von SCA5 zu sehen ist. β III Spektrin, welches in diesen Mäusen ausgeknockt wurde, wird physiologisch in Purkinjezellen, nicht aber in Bergmanngliazellen exprimiert (Perkins et al. 2010). Dennoch führt die Mutation in der Krankheitsprogression zu einer geringeren Expression von EAAT1 in Bergmanngliazellen, welche zeitlich auch mit dem Beginn der Purkinjezelldegeneration zusammenfällt (Perkins et al. 2010). Daher liegt es nahe,

dass Purkinjenzellen mit Bergmanngliazellen kommunizieren und somit die Reduktion von EAAT1 induzieren (Perkins et al. 2010). Daher ist es möglich, dass die reduzierte EAAT1-Expression in NPC1-defizienten Mäusen nicht primär auf dem genetischen Defekt der Bergmanngliazellen basiert, sondern über Signale der mutierten Purkinjenzellen ausgelöst wird. Um dies zu untersuchen, könnte die zerebelläre EAAT1-Expression im Purkinjenzellspezifischen NPC1-Knockout-Modell von Elrick et al. (2010) in Abhängigkeit des Alters und der Purkinjenzelldegeneration untersucht werden.

Perkins et al. (2018) untersuchten neben der Auswirkung eines EAAT1-Knockouts auf die Purkinjenzelldegeneration auch dessen Auswirkung auf die Funktion der Purkinjenzellen. An dieser Stelle gibt es Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denen von Perkins et al. (2018). Unter Verwendung einer physiologischen internen Chloridkonzentration wurden in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Aktivitätsmustersverteilung von Purkinjenzellen in den Lappen III-V zwischen NPC1^{+/+}- und NPC1^{-/-}-Mäusen gefunden. Dahingegen sind Aldolase C-negative Purkinjenzellen, die die Hauptpopulation der Purkinjenzellen in den anterioren Lappen darstellen, vermehrt inaktiv in EAAT1-Knockout-Mäusen (Perkins et al. 2018). Neben unterschiedlichen experimentellen Rahmenbedingungen der Patch-Clamp-Messungen, könnte dieser Unterschied darauf beruhen, dass in NPC1^{-/-}-Mäusen bevorzugt die Aktivität der überlebenden Aldolase C-positiven Zellen gemessen wurde, auf die ein EAAT1-Knockout geringeren Einfluss hat. Andererseits war in NPC1^{-/-}-Mäusen kein totaler Verlust von EAAT1 zu finden, was ebenfalls die Unterschiede in der Aktivitätsmustersverteilung erklären könnte. Letzteres zeigt sich zwischen den spinozerebellären Ataxien, in denen die Purkinjenzellaktivität unterschiedlich verändert ist, obwohl es Gemeinsamkeiten in der reduzierten EAAT-Expression gibt (Perkins et al. 2016a).

4.4 Die GABAerge synaptische Transmission zu Purkinjenzellen ist erhöht in NPC1^{-/-}-Mäusen

Neben der intrinsischen Aktionspotentialgenerierung der Purkinjenzellen wurde auch die synaptische Transmission zu diesen untersucht. Für NPC1 berichten mehrere Studien über Veränderungen der exzitatorischen synaptischen Transmission. In hippocampalen CA1-Pyramidenzellen und in Purkinjenzellen wurde eine erhöhte Frequenz von miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen beschrieben (Wasser et al. 2007; Sun et al. 2011). Zudem ist auch die Regulation der exzitatorischen synaptischen Transmission beeinträchtigt. Neurone des Neokortex wiesen eine gestörte LTP und Purkinjenzellen eine beeinträchtigte LTD auf (Avshalumov et al. 2012; Sun et al. 2011). In der hippocampalen CA1-Region reduzierte

sich zudem nicht die Feldpotentialantwort während einer AMPA-Applikation (D'Arcangelo et al. 2011).

Bezüglich der inhibitorischen Transmission wurde gezeigt, dass in einem NPC1-Mausmodell die Zahl der GABAergen Synapsen in der zerebellären Molekularschicht reduziert ist (Caporali et al. 2016). Weitere, und hier speziell funktionelle, Untersuchungen an Purkinjezellen lagen bisher aber nicht vor. Daher standen in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen der GABAergen synaptischen Transmission zu den Purkinjezellen im Vordergrund. Ausgangspunkt waren die Arbeiten von Perkins et al. (2018) an EAAT1-Knockout-Mäusen. In der Studie von Perkins et al. (2018) wurde vermutet, dass die Dysfunktion von Aldolase C-negativen Purkinjezellen in EAAT1-Knockout-Mäusen darauf basiert, dass durch die reduzierte Glutamattransporter-Expression Glutamat akkumuliert. Dieses würde dann präsynaptisch NMDA-Rezeptoren auf Interneuronen aktivieren, was die inhibitorische GABAerge synaptische Transmission zu Purkinjezellen steigert (Perkins et al. 2018; Duguid und Smart 2004; Liu und Lachamp 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die beschriebenen funktionellen Veränderungen der Aktionspotentialgenerierung in NPC1-defizienten Mäusen von der intrazellulären Chloridkonzentration abhängig waren. GABA, als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, induziert einen Chloridstrom wenn er an den GABA_A-Rezeptor bindet (Bowery und Smart 2006). Daher könnte eine veränderte GABAerge synaptische Transmission der Chloridabhängigkeit der beobachteten Effekte zugrunde liegen.

In dieser Arbeit wurden die Messungen an 19-25 Tage alten Mäusen durchgeführt in denen das Space-Clamp-Problem der Purkinjezellendriten noch nicht auftritt. Dabei wurde in Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen eine um 2,5 Hz höhere IPSC-Frequenz als in Kontrollmäusen gefunden. Vor dem Hintergrund der beschriebenen reduzierten Synapsenzahl überrascht dieses Ergebnis (Caporali et al. 2016). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Interneurone, welche die Purkinjezellen innervieren, konkret Korb- oder Sternzellen, eine erhöhte Aktivität aufweisen. Diese können, wie Purkinjezellen, intrinsisch Aktionspotentiale generieren, was über synaptische Eingänge moduliert werden kann (Häusser und Clark 1997; Liu und Lachamp 2006; Rudolph et al. 2016). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht ob die synaptische Regulation der präsynaptischen Interneurone eine mögliche Ursache der erhöhten IPSC-Frequenz in Purkinjezellen von NPC1-defizienten Mäusen darstellen kann.

4.5 Die veränderte GABAerge Transmission in Purkinjezellen von NPC1^{-/-}-Mäusen könnte auf einer gestörten PKC-abhängigen AMPA-Rezeptortranslokation beruhen

Die Korb- und Sternzellen werden von den Parallelfasern der Körnerzellen aktiviert (Huppelsberg und Walter 2005). Sind die Parallelfasern mit einer hohen Aktionspotentialfrequenz aktiv (80-100 Hz), schütten diese mehr Glutamat aus als die synaptischen Glutamattransporter aufnehmen können (Liu und Lachamp 2006; Balakrishnan und Bellamy 2009; Carter und Regehr 2000). Dieses Glutamat und/oder von Bergmanngliazellen freigesetztes Glutamat, Serin und Glyzin aktivieren extrasynaptische NMDA-Rezeptoren auf Sternzellen (Liu und Lachamp 2006; Rudolph et al. 2016; Duguid und Smart 2004). Der daraus resultierende Kalziumeinstrom aktiviert die PKC, welche daraufhin PICK1 phosphoryliert. PICK1 interagiert mit GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren und sorgt dafür, dass diese aus intrazellulären Vesikeln zur Postsynapse der Parallelfaser-Sternzellsynapse transportiert werden und an das Ankerprotein GRIP binden (Liu und Cull-Candy 2005; Liu und Zukin 2007). Gleichzeitig werden GluA2-negative AMPA-Rezeptoren internalisiert (Liu und Zukin 2007). Dieser Umbau steigert die Freisetzungsrates von GABA, was als gesteigerte IPSC-Frequenz in Purkinjezellen gemessen werden kann (Liu und Lachamp 2006; Rudolph et al. 2016). Dieser Prozess wird als inhibitorische Langzeitpotenzierung bezeichnet und führt zu einer stabilen Steigerung der GABA-Freisetzung (Liu und Lachamp 2006). Dass die NMDA-induzierte IPSC-Frequenzerhöhung in den vorliegenden Experimenten nur transient war, lag wahrscheinlich daran, dass eine Monoapplikation von NMDA durchgeführt wurde. Es wird vermutet, dass *in vivo*, durch den Kotransmitter Glyzin, die Desensitivierung der NMDA-Rezeptoren verhindert wird, wodurch ein längerer Kalziumeinstrom gewährleistet wird, welcher die Umstrukturierung stabilisiert und damit die Langzeitpotenzierung induziert (Liu und Lachamp 2006).

Die PKC ist aber auch verantwortlich für die Internalisierung von GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren aus der Synapse. Wird Ser880 an der GluA2-Untereinheit phosphoryliert, wird die Bindung zu GRIP gelöst, der Rezeptor diffundiert aus der postsynaptischen Membran und wird mithilfe von PICK1 internalisiert (Isaac et al. 2007). In diesen Prozessen könnte eine Dysfunktion der PKC zum Tragen kommen. An Fibroblasten von NPC1-Patienten konnte gezeigt werden, dass das Vimentinnetzwerk größere Filamente gegenüber dem feinen Netzwerk der Kontrolle aufweist (Walter et al. 2009). Zudem ist die Menge an löslichem Vimentin

reduziert (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013). Eine Steigerung der PKC-Aktivität durch PKC-Überexpression oder Behandlung mit PKC-Aktivatoren (Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Fettsäuren) erhöht die Fraktion löslichen Vimentins in NPC1-mutierten Zellen (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013). Dies reduziert zudem die Menge an akkumulierten Cholesterin in den Zellen (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013).

Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten vergleichbare Ergebnisse. Hierbei wurden aus Fibroblasten von NPC1-Patienten induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ) gewonnen und zu einer Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen differenziert (neuronal differenzierte Zellen; NDZ; Trilck et al. 2013; Trilck et al. 2017; Peter et al. 2017b). Die Ergebnisse zeigten, dass die Intermediärfilamente Vimentin und GFAP hypophosphoryliert sind (Peter et al. 2017a). Da diese von der PKC phosphoryliert werden und eine Stimulation der PKC mit PMA die Veränderung in den NPC1-mutierten Zellen umkehrt, wurde geschlussfolgert, dass die PKC in NPC1 einer Dysfunktion unterliegt. Dieser Hypothese folgend, würden durch eine reduzierte Ser880-Phosphorylierung von GluA2, GluA2-positive AMPA-Rezeptoren in der Subsynapse verweilen und nicht ausgetauscht werden können, was die erhöhte IPSC-Grundfrequenz in Purkinjezellen NPC1-defizienter Mäuse erklären würde. Das deckt sich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, da die zerebelläre GluA2-Expression auf dem Niveau der Kontrolle lag, jedoch die Menge an Ser880-phosphorylierten GluA2 signifikant reduziert war. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit den oben erwähnten humanen neuronalen Zellen erzielt (Rabenstein et al. 2017). Ein Vergleich der Expression von GluA1-4 zeigte, dass in allen NDZ-Linien mit NPC1-Mutation GluA2 höher exprimiert wird (Rabenstein et al. 2017). Sowohl Aufreinigungen der Membranfraktion als auch von Biotin-markierten Oberflächenproteinen zeigten, dass signifikant mehr GluA2 in der Zellmembran lokalisiert ist (Rabenstein et al. 2017). Die höhere GluA2-Expression war auch in funktionalen Untersuchungen sichtbar. GluA2-positive AMPA-Rezeptoren haben gegenüber GluA2-negativen AMPA-Rezeptoren eine reduzierte Kanalleitfähigkeit und sind in editierter Form, wie sie meist in reifen Neuronen anzutreffen ist, nicht kalziumpermeabel (Traynelis et al. 2010). Das stimmt mit Patch-Clamp-Messungen überein, in denen ein AMPA-induzierter Strom in zwei NDZ-Linien mit NPC1-Mutation reduziert war (Rabenstein et al. 2017). Zudem war in allen drei NDZ-Linien der AMPA-induzierte Kalziumstrom in mikrofluorimetrischen Kalziummessungen gegenüber der Kontrollzelllinie signifikant reduziert (Rabenstein et al. 2017). Der Austausch von AMPA-Rezeptoren unterschiedlicher Zusammensetzung ist wichtig für die synaptische Plastizität (Isaac et al. 2007). Dass diese in NPC1 gestört ist, wurde für Neuronen des Neokortex

(gestörte LTP), für Purkinjenzellen (gestörte LTD) und für die hippocampale CA1-Region (keine Reduktion der Feldpotentialantwort während einer AMPA-Applikation) gezeigt (Avshalumov et al. 2012; Sun et al. 2011; D'Arcangelo et al. 2011). Zudem ist die Frequenz von miniatur exzitatorischen postsynaptischen Strömen sowohl in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen als auch in Purkinjenzellen erhöht, was zusammen mit der gestörten synaptischen Plastizität auf eine Übererregbarkeit der Neurone schließen lässt (Wasser et al. 2007; Sun et al. 2011). Dies kann zu epileptischen Anfällen führen, einem Symptom in NPC1 (Holmes 1995; Vanier 2010). Jedoch sind nicht alle Hirnareale und Systeme gleichermaßen betroffen. Sowohl im dorsomedialen Striatum, als auch in der hippocampalen CA1-Region konnte, wie in der Kontrolle, eine LTP induziert werden (Avshalumov et al. 2012). Ebenfalls zeigten Messungen aus unserer Arbeitsgruppe, dass die Frequenz spontaner IPSC in CA1-Pyramidenzellen in NPC1^{-/-}-Mäusen nicht verändert ist (Frech et al. 2015). Diese Unterschiede sind jedoch kaum überraschend, da sich die Mechanismen der synaptischen Plastizität zwischen verschiedenen Gehirnarealen stark unterscheiden können. So induziert eine höhere postsynaptische Kalziumkonzentration in CA1-Pyramidenzellen eine LTP, während in Purkinjenzellen eine LTD eingeleitet wird (Lynch 2002; van Beugen et al. 2014). Dadurch wirkt sich eine gestörte PKC-Funktion ebenfalls unterschiedlich auf die synaptische Plastizität aus, zumal auch eine Phosphorylierung von GluA1-Untereinheiten involviert ist, welche von der PKA vermittelt wird (Lee 2012; Liu und Zukin 2007). Dadurch ist nicht nur eine totale Inhibition sondern auch ein Ungleichgewicht der synaptischen Plastizität möglich.

Was jedoch gegen eine generelle PKC-Inhibition in NPC1 spricht ist, dass auch der Transport von GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren in die Membran von Sternzellen PKC abhängig ist (Liu und Cull-Candy 2005; Liu und Zukin 2007). Die in dieser Arbeit gemessene höhere IPSC-Frequenz spricht jedoch dafür, dass dieser Prozess nicht inhibiert ist. Daher wurde ein Antikörper gegen phosphorylierte PKC-Zielsequenzen genutzt, um abzuschätzen ob die Funktion von PKC in NPC1^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt ist. Im Kleinhirn von p22 NPC1^{-/-}-Mäusen lag eine nicht signifikante Hypophosphorylierung vor, jedoch war in p55 NPC1^{-/-}-Mäusen eine signifikante Hyperphosphorylierung der PKC-Substrate vorhanden.

Diese beobachtete Hyperphosphorylierung der PKC-Substrate wurde von Chopra et al. (2018) auch in Mäusen und Patienten mit SCA1 und 2 sowie der Multisystematrophie, in der auch Purkinjenzellen degenerieren können, beschrieben. Dabei wird vermutet, dass die gesteigerte PKC-Aktivität neuroprotektiv wirkt, da eine Inhibition dieser die Purkinjenzelldegeneration im Mausmodell verstärkte (Chopra et al. 2018). Neben einer Hyperphosphorylierung der

PKC-Substrate, identifizierten Chopra et al. (2018) auch eine Hyperphosphorylierung des PKC-Substrates Ser880-GluA2 im Kleinhirn von SCA1-Mäusen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, in der trotz der beobachteten Hyperphosphorylierung der PKC-Substrate eine signifikante Hypophosphorylierung von Ser880-GluA2 in NPC1^{-/-}-Mäusen vorlag. Mögliche Ursache für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Ser880-Phosphorylierung von GluA2 in NPC1-defizienten Mäusen nicht beeinflusst ist, jedoch die internalisierten GluA2-positiven AMPA-Rezeptoren schneller wieder zur Zellmembran transportiert oder schneller degradiert werden (Widagdo et al. 2015). Dadurch würde bei gleicher PKC-Funktionalität die Gesamtmenge an Ser880-phosphorylierten GluA2 reduziert sein. Gegen eine erhöhte Degradationsrate spricht, dass diese über das endolysosomale System läuft. Dieses basiert auf einer Verschmelzung von Endosomen mit Lysosomen, in denen der Inhalt der Vesikel degradiert wird (Widagdo et al. 2015). Dabei ist das NPC1-Protein in den Endosomen und Endolysosomen lokalisiert und dessen Defekt führt zur Akkumulation der Endolysosomen (Tang et al. 2010). Dadurch könnte der Degradationsweg der AMPA-Rezeptoren in NPC1 inhibiert sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die PKC-Funktion nicht ubiquitär sondern in bestimmten Zellkompartimenten eingeschränkt sein könnte. Die PKC liegt zytosolisch aktiviert vor, wird jedoch von einer Protein-internen Pseudosubstratdomäne inhibiert (Amadio et al. 2006). Kommt die PKC mit Kalziumionen, Diacylglycerol und/oder Phosphatidylserin in Kontakt, löst sich die Pseudosubstratdomäne von der katalytischen Domäne und die PKC wird katalytisch aktiv (Amadio et al. 2006). Die katalytisch aktive PKC interagiert dann mit Strukturproteinen, z. B. Receptor for activated C kinase (RACKs) und wird dadurch in verschiedene Zellkompartimente transportiert (Amadio et al. 2006). Ist dieser Translokationsprozess gestört, kann es zu pathologischen Veränderungen kommen. Ein Beispiel ist SCA14, in der Mutationen in der PKC γ vorliegen (Sakai et al. 2011). Dabei zeigen Studien, dass in einigen bekannten Mutationen von SCA14 die PKC γ Aktivität gesteigert, die Membranretentionszeit nach Aktivierung jedoch reduziert ist (Sakai et al. 2011). Deshalb wird angenommen, dass die Verweildauer der PKC γ an der Membran nicht hoch genug und somit ihre Funktion dort eingeschränkt ist (Sakai et al. 2011). Dadurch könnte es gleichzeitig zu einer zytosolischen PKC Hyperaktivität kommen (Sakai et al. 2011).

Durch die Störung im Cholesterolhaushalt ist möglicherweise die Lipidkomposition der Zellmembran in NPC1 verändert, was die Retentionszeit der PKC an der Membran reduzieren

könnte. Dadurch könnte der neuroprotektive Effekt der gesteigerten PKC-Aktivität in NPC1 gestört werden.

4.6 Die PKC-Aktivität ist ein potentieller Marker zur Identifizierung und Charakterisierung therapeutisch wirksamer Substanzen

In NPC1-defizienten Mäusen wurde in dieser Arbeit eine Hypophosphorylierung von GluA2 und in anderen Arbeiten in humanen Zellkulturmodellen eine Hypophosphorylierung von Vimentin und GFAP gefunden (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Wenn die Translokation der PKC, wie in SCA14, gestört ist, sprechen die Erkenntnisse dafür, dass die Interaktion sowohl mit der Membran als auch dem Zytoskelett beeinträchtigt ist. Um dies zu prüfen könnte sowohl die Membranfraktion als auch die zytoskelettale Zellfraktion aufgereinigt und die Menge an PKC in diesen Fraktionen quantifiziert werden. Gleichzeitig könnten in einem Gesamtzelllysat im Western Blot Antikörper gegen zytosolische PKC-Substrate eingesetzt werden, um zu testen ob dort eine Hyperaktivität der PKC vorliegt. Dabei besteht jedoch die Schwierigkeit die richtigen Zielproteine zu wählen. Abhängig von der Auswahl könnten sich die Ergebnisse unterscheiden, wenn nicht alle zytosolischen PKC-Substrate in NPC1 betroffen sein sollten. Daher wäre ein aufwändigerer Ansatz zur Identifizierung von hypo- und hyperphosphorylierten PKC-Substraten zielführender. Dabei würden zuerst die phosphorylierten PKC-Substrate in einer Immunpräzipitation isoliert und anschließend massenspektrometrisch die Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Bei diesem Ansatz könnten viele Proteine parallel identifiziert werden und diese müssen entgegen dem Western Blot Ansatz nicht initial bekannt sein. In Datenbanken könnten dann die identifizierten Proteine, ähnlich wie bei Genexpressionsdaten von Microarrays, ontologisch klassifiziert werden. Anschließend könnte geprüft werden, ob bestimmte Funktionsklassen oder Expressionskompartimente in NPC1 gehäuft von PKCs unterschiedlich phosphoryliert werden. Mit dieser Grundlage könnten dann Proteine als Therapiemarker gewählt werden, um zu prüfen ob die in NPC1 derzeit getesteten Therapieoptionen (Cyclodextrin, PKC-Aktivatoren, Histondeazetylaseinhibitoren) einen positiven Einfluss auf die PKC vermittelte Phosphorylierung haben (Camargo et al. 2001; Davidson et al. 2009; Helquist et al. 2013; Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a; Santos-Lozano et al. 2015).

4.7 PKC-Modulatoren sind vielversprechende Therapieoption in NPC1 und anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Bei Therapieansätzen muss generell beachtet werden, dass die Purkinjezelldegeneration zwar ein zentrales pathophysiologisches Ereignis in NPC1 ist, jedoch zumindest im Mausmodell nicht zum Tod führt. Eine Purkinjezellspezifische Deletion von NPC1 in Mäusen rekapitulierte die Purkinjezelldegeneration und motorischen Einschränkungen der NPC1^{-/-}-Mäuse, wenn auch die Progression etwas langsamer war (Elrick et al. 2010). Während NPC1^{-/-}-Mäuse jedoch nach 8-11 Wochen der Krankheit erliegen, zeigten Mäuse mit dem Purkinjezellspezifischen Knockout von NPC1 keine erhöhte Mortalität und eine normale Körpergewichtszunahme (Elrick et al. 2010). Das legt nahe, dass die Purkinjezelldegeneration als isolierte Komponente der NPC1-Pathophysiologie betrachtet werden und dies entsprechend in der Therapie berücksichtigt werden kann. Derzeit steht der Glucosylceramidsynthaseinhibitor Miglustat als Therapieoption für NPC1-Patienten zur Verfügung, welcher die Progression jedoch nur verlangsamt und zudem in den USA nicht von der Food and Drug Administration für die Behandlung von NPC1 zugelassen ist (Lyseng-Williamson 2014). Vielversprechender und derzeit in klinischen Studien sind Cyclodextrine. Diese werden als Adjuvantien verwendet, da sie hydrophobe Wirkstoffe emulgieren. Es wurde gezeigt, dass Cyclodextrine die Cholesterollakkumulation in NPC1 reduzieren und die Lebenserwartung von NPC1^{-/-}-Mäusen verlängern (Camargo et al. 2001; Davidson et al. 2009). Während die viszerale Pathophysiologie sehr gut mit Cyclodextrinen korrigiert werden kann, können diese nicht oder nur sehr schwer die Blut-Hirn-Schranke passieren, was ihre Wirksamkeit im Gehirn limitiert (Liu et al. 2010a; Calias 2017). Alternativ höhere Dosen oder eine intrathekale Applikation zu wählen erhöht dabei auch das Risiko von Nebenwirkungen. Wenn jedoch die Purkinjezellpathologie unabhängig von der viszeralen Pathophysiologie ist, könnten diese auch in einer Kombinationstherapie separat behandelt werden. Mögliche Kombinationspartner der Cyclodextrine könnten PKC-Aktivatoren darstellen, die *in vitro* die Cholesterollakkumulation sowie Veränderungen der Intermediärfilamente von NPC1-mutierten Zellen korrigieren können (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Konkret wurde in diesen Studien der Phorbolester PMA verwendet, der jedoch auch das Wachstum von Tumoren fördern kann (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a; Keck et al. 2012). Eine Alternative stellen Bryostatine dar, welche wie im Beispiel von Bryostatin-1 nicht die Expression des tumorwachstumsfördernden Proteins RasGRP3 verstärken und die für die Behandlung von NPC1 und anderen lysosomalen Speichererkrankungen bereits patentiert wurden (Yang et al.

2011; Keck et al. 2012; Alkon 2017; Neurotrope Bioscience und The Mount Sinai Hospital 2017). Bryostatine sind Makrolide die wie Phorbolster mit der DAG-Bindungsstelle (C-1 regulatorische Domäne) interagieren (Trindade-Silva et al. 2010). Gleichzeitig bindet die aliphatische Kohlenwasserstoffkette von Bryostatin Lipidmembranen und verankert dadurch die gebundene PKC an die zellulären Membranen (Nelson und Alkon 2009). Dadurch kommt es bei Bryostatin-1 zu einer Steigerung der PKC-Aktivität. Bryostatin-1 verändert zudem die Expression von PKCs (Kedei et al. 2013; Szallasi et al. 1994). In einer Leukämiezelllinie reduziert eine 24-stündige Behandlung die Expression der Isoformen PKC α , β 1 und β 2, während die Expression von PKC ϵ unverändert blieb (Kedei et al. 2013). Bei PKC δ reduzierten niedrige Bryostatin-1-Konzentrationen dessen Expression und hohe Dosen erhöhten diese (Kedei et al. 2013). Bei längerer Behandlung eines Mausmodells von Morbus Alzheimer erhöhte Bryostatin-1 dagegen die Expression von PKC α und PKC ϵ im Hippokampus (Hongpaisan et al. 2011). Ebenfalls reduzieren PKC-Aktivatoren die Ablagerung von β -Amyloidplaques und Veränderungen von Neurofibrillenbündeln, beides sind pathophysiologische Merkmale, die auch in NPC1 zu beobachten sind (Etcheberrigaray et al. 2004; Ballatore et al. 2007; Hongpaisan et al. 2011; Vanier und Suzuki 1998). In Morbus Alzheimer konnten klinische Studien schon einen positiven Effekt von Bryostatin-1 zeigen (Nelson et al. 2017). Daneben gibt es noch weitere Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie des Morbus Alzheimer und NPC1. In Morbus Alzheimer wurde eine Purkinjezelldegeneration beschrieben und eine gestörte Cholesterollhomöostase ist Risikofaktor und Teil der Pathophysiologie (Fukutani et al. 1996; Leduc et al. 2010). Untersuchungen zeigten zudem, dass die PKC ϵ -Level in hippokampalen CA1-Pyramidenzellen und Hautfibroblasten von Morbus Alzheimer Patienten reduziert sind (Khan et al. 2015). In Mausmodellen zeigte sich, dass wie in NPC1, im Morbus Alzheimer Veränderungen in der AMPA-Rezeptorexpression, der dendritischen Dornenfortsätze und dem Zytoskelett vorhanden sind (Baglietto-Vargas et al. 2018; Knobloch und Mansuy 2008; Dorostkar et al. 2015). Dies spricht dafür, dass bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen ähnliche pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen, die sich in ihren Ausprägungen aber unterscheiden können. Während z. B. in NPC1 eine erhöhte GluA2-Oberflächenexpression und Veränderungen in den Intermediärfilamenten bekannt sind, ist im Morbus Alzheimer die GluA2-Oberflächenexpression reduziert und das Aktin-Zytoskelett verändert (Rabenstein et al. 2017; Higashi et al. 1993; Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a; Baglietto-Vargas et al. 2018; Armstrong et al. 1994; Ikonovic et al. 1997; Liu et al. 2010c).

In Morbus Alzheimer wird vermutet, dass Beta-Amyloid Kalziumporen bildet und dies zu einem chronisch erhöhten intrazellulären Kalziumgehalt führt (Popugaeva et al. 2017; Kawahara et al. 1997). Dieses aktiviert die PKC, und induziert über eine gesteigerte Ser880-GluA2-Phosphorylierung LTD in hippokampalen Neuronen (Liu et al. 2010c). Eine langfristige Aktivierung der PKC führt zu deren Degradation und somit zu einer niedrigeren Expression dieser Kinasen (Newton 2010; Hansra et al. 1999). Die fehlende expressionsbedingte Aktivität der PKC mündet wiederum in eine verstärkte Bildung von Beta-Amyloid und verstärkt daher die Pathophysiologie (da Cruz e Silva et al. 2009). Eine PKC-Dysregulation stellt eine potentielle Überschneidung mit den hier gezeigten Ergebnissen in NPC1-defizienten Mäusen dar und macht die PKC als therapeutisch modulierbare Zielstruktur interessant. Studien zur Wirkung von Bryostatinen in lysosomalen Speichererkrankungen stehen jedoch noch aus, weswegen es noch offen ist, ob diese als Wirkstoffe für die Behandlung von NPC1 in Betracht kommen. Daher ist es, basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit und aufgrund fehlender Studien zur Wirkung von Bryostatinen in lysosomalen Speichererkrankungen, von Interesse zu prüfen, ob eine Behandlung mit Bryostatinen und/oder Cyclodextrinen die beobachteten Veränderungen in NPC1^{-/-}-Mäusen aufheben könnte.

4.8 Mögliche Untersuchungen über die veränderte GluA2-Oberflächenexpression in Purkinjezellen von NPC1^{-/-}-Mäusen

Bevor Therapieoptionen getestet werden können muss geprüft werden, ob die chloridabhängig veränderten Aktivitätsmuster und der TBOA Einfluss der p45-p56 Mäuse und die reduzierte IPSC Frequenz und veränderte NMDA-abhängige Modulation der p19-p25 Mäuse auf der gleichen molekularen Veränderung beruhen. Da IPSC-Messungen durch den großen Dendritenbaum in p45-p56 Purkinjezellen aufgrund des oben erwähnten Space-Clamp-Problems nicht möglich sind, würde umgekehrt geprüft werden müssen, ob die Aktivitätsmustersverteilung in jungen NPC1^{-/-}-Mäusen bereits verändert ist (Molleman 2005). Ebenfalls sollte die Expression der EAAT in p22 NPC1^{-/-}-Mäusen ermittelt werden, um zu prüfen, ob diese in diesem Alter ebenfalls gegenüber Kontrollmäusen reduziert ist. Gleichzeitig müssten die IPSC-Messungen noch um weitere Experimente ergänzt werden. Da die Vermutung vorliegt, dass die NMDA-vermittelte Steigerung der IPSC-Frequenz auf einer gesteigerten Aktivierung von AMPA-Rezeptoren basiert, müsste geprüft werden, ob diese mit einem Antagonisten gegen AMPA-Rezeptoren inhibiert werden kann. Eine konkrete Beteiligung GluA2-positiver AMPA-Rezeptoren könnte eine Inkubation mit

1-Naphthylacetylspermin, einem Antagonisten gegen GluA2-negative AMPA-Rezeptoren, vor der NMDA-Applikation zeigen (Koike et al. 1997). Zu erwarten wäre, dass die IPSC-Frequenzsteigerung durch den Antagonisten nicht beeinflusst wird, da diese durch die Translokation GluA2-positiver AMPA-Rezeptoren in die Subsynapse induziert wird. Da Störungen von LTP und LTD in NPC1 beschrieben sind, kann auch Glyzin zusammen mit NMDA appliziert werden (Liu und Lachamp 2006; Avchalumov et al. 2012; Sun et al. 2011). Diese Koapplikation ermöglicht es zu prüfen, ob neben Störungen der akuten induzierten Frequenzerhöhung auch Störungen in der Stabilisierung der potenzierten Synapsen in NPC1-defizienten Mäusen vorliegen (Liu und Lachamp 2006). Physiologisch führt die Aktivierung von Parallelfasern und Bergmanngliazellen zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf Interneuronen (Rudolph et al. 2016; Sun und June Liu 2007). Daher können anstatt der NMDA-Applikation auch die Parallelfasern stimuliert werden, was ebenfalls die IPSC-Frequenz steigern müsste. Da in dieser Arbeit in NPC1 bereits eine Störung auf Ebene der Interneuronen gefunden wurde, können Störungen der davorliegenden Signaltransmission zwischen Bergmannglia und Interneuron nicht an Purkinjezellen gemessen werden. Dies macht Patch-Clamp-Messungen an den Interneuronen interessant. Es ist beschrieben, dass die Aktivierung der P2Y1-Rezeptoren von Bergmanngliazellen mit Adenosindiphosphat (ADP) diese aktivieren wodurch diese Glutamat, Serin und Glyzin freisetzen (Liu und Lachamp 2006; Rudolph et al. 2016). Diese Freisetzung aktiviert NMDA-Rezeptoren auf nachgeschalteten Interneuronen (Rudolph et al. 2016). Daher würde eine ADP-Applikation einen NMDA-Strom in den Interneuronen induzieren, der in Ganzzellmessungen erfasst werden kann. Ebenfalls müssten bei einem veränderten AMPA-Rezeptorbesatz die Amplituden und Kinetiken der EPSC in den Interneuronen verändert sein. Eine Alternative dazu würde die Kombination aus Parallelfaserstimulation und Spermin in der Intrazellulärlösung bieten. Spermin inhibiert GluA2-negative AMPA-Rezeptoren bei positiven Membranpotentialen, was in einem Strom-Spannungs-Diagramm als einwärts gerichteter Strom sichtbar ist (Isa et al. 1995). Zur Quantifizierung wird die Amplitude des induzierten EPSCs bei einem positiven Haltepotential durch die bei einem negativen Haltepotential geteilt, z. B. $I_{40\text{ mV}}/I_{-60\text{ mV}}$ (Savtchouk und Liu 2011). Diese Ratio wird als Gleichrichtungsindex (Rectification Index) bezeichnet (Isa et al. 1995). Je größer der Anteil der GluA2-negativen AMPA-Rezeptoren am Gesamtstrom des induzierten EPSCs ist, desto kleiner wird die Ratio, da Spermin deren Leitfähigkeit bei positiven Haltepotentialen inhibiert (Liu und Cull-Candy 2000). Daher wäre zu erwarten, dass in zerebellären Interneuronen von NPC1^{-/-}-Mäusen der Gleichrichtungsindex größer ist, da

mehr GluA2-positive AMPA-Rezeptoren in der Membran zu erwarten sind. Eine Behandlung der Mäuse oder der Kleinhirnschnitte mit PKC-Aktivatoren müsste dann diesen Index senken. Durch Patch-Clamp-Messungen an Interneuronen kann zudem auch geprüft werden, ob deren intrinsische Aktionspotentialgenerierung in NPC1-defizienten Mäusen gestört ist. Diese Messungen entsprechen dabei den Messungen der Aktionspotentialgenerierung der Purkinjezellen, wobei Antagonisten gegen AMPA- und GABA-Rezeptoren eingesetzt werden müssten, um potentielle Netzwerkeffekte auszuschließen.

4.9 Die gefundenen pathophysiologischen Veränderungen in NPC1^{-/-}-Mäusen könnten auf einer Dysfunktion von Mitochondrien beruhen

Die bisher aufgezeigten möglichen nächsten Schritte zeigen, dass die vorliegende Arbeit einen weiteren grundlegenden Baustein zum Verständnis der Pathophysiologie in NPC1 und insbesondere im komplexen System des Kleinhirns darstellt. Eine Frage, die jedoch offen bleibt, ist, ob die veränderte synaptische Transmission oder die reduzierte EAAT-Expression zu einer Störung der Kalziumhomöostase führen und damit ursächlich für die Degeneration der Purkinjezellen in NPC1-defizienten Mäusen sind. Die Veränderungen von Intermediärfilamenten, welche auch von unserer Arbeitsgruppe in humanen NPC1-mutierten Zellen gefunden wurden, können auf einen alternativen Mechanismus hindeuten (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Um ihren Dendritenbaum zu erhalten, müssen der Transport und die Funktion von Mitochondrien in Purkinjezellen gewährleistet sein (López-Doménech et al. 2016; Huang und Verbeek 2018). Dabei dient das Zytoskelett als Schienensystem, über das Organellen innerhalb der Zellen transportiert werden (Rogers und Gelfand 2000). Die Vimentin- und GFAP-Filamente des Zytoskelettes zeigen in NPC1-mutierten Zellen eine unorganisierte Struktur aus kürzeren Intermediärfilamenten auf (Peter et al. 2017a). Dies könnte den Mitochondrientransport beeinträchtigen. Karten et al. (2003) zeigten, dass in NPC1-defizienten Neuronen der retrograde axonale Transport endogen synthetisierten Cholesterols reduziert ist. Sollte eine generelle Transportstörung in NPC1 vorliegen, würden auch Mitochondrien nicht mehr in die Dendriten transportiert werden. Dieser Transport ist jedoch wichtig um den Dendritenbaum zu entwickeln und zu erhalten, wie z. B. eine Deaktivierung der GTPase Miro1 zeigt, durch die die Interaktion der Mitochondrien mit Motorproteinen eingeschränkt ist (López-Doménech et al. 2016). Die veränderte Vimentinstruktur hat jedoch nicht nur Einfluss auf die Mobilität von Mitochondrien, sondern auch auf deren Funktion (Chernoivanenko et al. 2015). Interagiert Vimentin mit der mitochondrialen Membran, depolarisiert diese und die Synthese von Adenosintriphosphat

(ATP) reduziert sich (Chernoivanenko et al. 2015). Während reduzierte ATP-Level sowohl in NPC1-defizienten Mäusen als auch in von NPC1-Patienten gewonnenen Fibroblasten beschrieben sind, sind im Mausmodell nur die neuronalen Mitochondrien als depolarisiert beschrieben worden (Yu et al. 2005; Woś et al. 2016). Morphologisch sind in NPC1 die Mitochondrien deformiert und unphysiologisch angehäuft (Yu et al. 2005; Woś et al. 2016). Dies kann die Grundlage der veränderten Morphologie von Purkinjezellendriten sein, wie sie in NPC1-defizienten Mäusen beschrieben worden ist (Sarna und Hawkes 2003). Der Energiemangel kann sich auch auf die Funktion der Purkinjezellen auswirken. Der Aufbau der für die neuronale Aktivität notwendigen Ionengradienten, die Synthese und der Transport von Neurotransmittern sowie die Regulation der Oberflächenexpression von Rezeptoren sind ATP-abhängig. Aber auch in den Gliazellen um die Neuronen ist eine korrekte Translokation von Mitochondrien wichtig. Bei hoher neuronaler Aktivität immobilisieren Astrozyten Mitochondrien neben Glutamattransportern, wodurch es nahe liegt, dass die Glutamattransporter die Nähe zu Mitochondrien brauchen, um ihre Funktion korrekt durchführen zu können (Jackson et al. 2014). Ein gestörter Transport von Mitochondrien und/oder eine reduzierte ATP-Synthese könnten daher die funktionellen Veränderungen verursachen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden. Um zu prüfen, ob eine Transportstörung von Mitochondrien in NPC1 vorliegt, bietet es sich an, die Mitochondrien in lebenden Zellen zu färben und deren Bewegung im Dendritenbaum von Purkinjezellen aufzuzeichnen und in Bezug zu morphologischen Veränderungen des Dendritenbaumes zu setzen. Dies setzt jedoch voraus, dass die Mitochondrien und/oder die Dendritenbäume einzelner Purkinjezellen gefärbt werden können. Da die Molekularschicht im Kleinhirn dicht gepackt mit Purkinjezellendriten ist, ist dies eine Herausforderung in akuten Kleinhirnschnitten. Daher bieten die Fortschritte der letzten Jahre im Bereich der Differenzierung von Purkinjezellen aus humanen iPSZ ein Modell, in dem Purkinjezellen auch vereinzelt wachsen (Ishida et al. 2016; Wang et al. 2015; Watson et al. 2018). Da dieser Schritt der Differenzierung von iPSZ zu Purkinjezellen in unserer Arbeitsgruppe noch aussteht und für NPC1 auch in der Literatur noch keine iPSZ-basierten Purkinjezellen beschrieben wurden, müsste das Modell zuerst etabliert und charakterisiert werden. Dabei wäre zu prüfen, ob sich der Dendritenbaum korrekt entwickelt und ob die Purkinjezellen auch ihre Spontanaktivität ausbilden. Des Weiteren wäre zu untersuchen, ob diese iPSZ-basierten Purkinjezellen bei Vorliegen von NPC1-Mutationen *in vitro* degenerieren. Falls ja, würde dieses Zellkulturmodell den Vorteil bieten, dass die pathophysiologischen Auswirkungen von NPC1-Mutationen auf

Purkinjezellen, wie sie in Patienten zu finden sind, untersucht werden können. Gleichzeitig könnten über das Zellkulturmedium potentiell therapeutisch wirksamen Substanzen einfach appliziert und deren Effekt untersucht werden. Bedauerlicherweise ist ein Hauptargument für die iPSZ-Technologie, nämlich die Reduzierung von Versuchstieren, bei diesem Ansatz nur bedingt anwendbar. Von den hier zitierten Protokollen findet bei zweien die Differenzierung der Purkinjezellen in Kokultivierung mit akut gewonnenen murinen Neuronen statt (Ishida et al. 2016; Watson et al. 2018). Beim dritten wurden dafür die Progenitorzellen auf Kleinhirnschnitten kultiviert (Wang et al. 2015). Dafür wurden Kleinhirnschnitte von Mäusen, Ratten oder abgetriebenen, humanen Föten verwendet (Wang et al. 2015). Dabei entwickelten nur auf den letzteren, den ethisch am problematischsten, die Purkinjezellen ihre typische Spontanaktivität (Wang et al. 2015). Ebenfalls ein Nachteil der bisher veröffentlichten Differenzierungsprotokolle ist, dass durch die zweidimensionale Kultivierung die synaptische Verschaltung, sofern sie stattfindet, nicht der *in vivo* Situation entspricht (Watson et al. 2018; Wong et al. 2017). 3D-Kulturen wären diesbezüglich eine Alternative, jedoch wurde bisher kein Protokoll für humane iPSZ-basierte Kleinhirnzellen publiziert. Ebenso könnte die dreidimensionale Struktur das Beobachten der Mitochondrienbewegung im Mikroskop erschweren, sofern die Purkinjezellendriten nicht wie *in vivo* nahezu zweidimensional wachsen (Wong et al. 2017; Watson et al. 2018). Daher bleibt weiterhin offen, ob mit Purkinjezellen aus iPSZ sowohl die Mitochondrienmobilität als auch die in der vorliegenden Arbeit im Mausmodell gefundenen, funktionellen Veränderungen messbar wären. Eine Alternative wäre die Färbung der Mitochondrien von Purkinjezellen in murinen Kleinhirnschnitten. Allerdings fallen jedoch aufgrund der bereits genannten Dichte an Dendriten in der Molekularschicht eine generelle Färbung mittels Mitochondrienfarbstoffen oder eine Purkinjezellspezifische Expression fluoreszenz-getaggtter mitochondrialer Proteine als Methoden aus. Ein Lösungsansatz wäre eine selektive Transfektion mit Genen für fluoreszenz-getaggte mitochondriale Proteine, bei der nur einzelne Purkinjezellen markiert werden. Ein Transduktionssystem das dies ermöglicht ist das BacMam-System. Dabei schleusen Baculoviren das an einen Säugetierpromotor gekoppelte Zielgen in die Zellen ein (Mansouri und Berger 2018). Die teilweise niedrige Transduktionseffizienz wäre dabei für die vorhandene Fragestellung vorteilhaft (Mansouri und Berger 2018). Erste Versuche mit NDZ konnten zeigen, dass in der Gesamtkultur einzelne Zellen mit diesem System fluoreszenz-getaggt werden können.

Da diese Insektenviren sich nicht in Säugetierzellen vermehren können und sich die transduzierten Gene nicht in das Genom der Zelle einbauen, ist die Transduktion transient (Mansouri und Berger 2018). Das setzt voraus, dass die Zellen bis zu 48 Stunden vor dem Experiment mit den Viren inkubiert werden müssen. Akute, adulte Kleinhirnschnitte sind jedoch nicht so lange kultivierbar. Es könnten jedoch anstelle von akuten Schnitten, zerebelläre Schnittkulturen von NPC1-defizienten und Kontrollmäusen eingesetzt werden. Marschalek et al. (2014) konnten zeigen, dass sie Kleinhirnschnitte 9-11 Tage nach Geburt der NPC1-defizienten Mäuse generieren und für 42 Tage kultivieren konnten. In dieser Zeit degenerierten die Purkinjezellen ähnlich der *in vivo* Situation (Marschalek et al. 2014). Daher stellen Kleinhirnschnittkulturen ein Modell dar, in dem weitere Fragestellungen bzgl. relevanter Parameter, wie Purkinjezelldegeneration, spontane Aktionspotentialgenerierung, synaptische Transmission und mitochondriale Mobilität, zugänglich wären. Gleichzeitig bieten sie auch die Möglichkeit, eine Substanztestung über das Zellkulturmedium durchzuführen und damit auch Therapieoptionen, wie PKC-Aktivatoren, zu testen.

4.10 Fazit

Ziel der Arbeit war es, funktionelle Veränderungen von zerebellären Purkinjezellen in einem NPC1-Mausmodell im Vergleich zu Wildtypmäusen zu charakterisieren und somit ein tieferes Verständnis der pathophysiologischen Merkmale bzw. Prozesse von NPC1 zu erlangen. Hierfür wurde zum einen die intrinsische Aktivität der Purkinjezellen, sowie der Einfluss von EAAT auf diese untersucht. Zum anderen wurde die inhibitorische synaptische Transmission auf ihre Frequenz und Regulation analysiert. Zu diesen Punkten lagen bisher keine Erkenntnisse vor. In dieser Arbeit wurden Veränderungen in NPC1-defizienten Mäusen gefunden, welche Ziel einer therapeutischen Intervention sein könnten. Hierzu gehören zum einen die Veränderung der Aktionspotentialgenerierung von Purkinjezellen in NPC1-defizienten Mäusen, zum anderen die reduzierte zerebelläre Proteinexpression von EAAT1, 2 und 4, welche sich mit Erkenntnissen aus Studien des Hippokampus NPC1-defizienter und des Kleinhirns von $Npc1^{nmfl64}$ -Mäusen decken (Byun et al. 2006; Caporali et al. 2016). Weiterhin wurde eine erhöhte inhibitorische synaptische Transmission zu Purkinjezellen in NPC1 und deren gestörte Regulation erstmals beschrieben. Zusammen mit dem Befund einer reduzierten Menge an P-Ser880-GluA2 unterstützen diese Erkenntnisse die Hypothese, dass Veränderungen der inhibitorischen synaptischen Transmission, Störungen der synaptischen Plastizität und Veränderungen in der AMPA-Rezeptorexpression zu den pathogenen Mechanismen in NPC1 beitragen (D'Arcangelo et al. 2011; Sun et al. 2011; Avchalumov et al. 2012; Rabenstein et al.

2017). Die Annahme, dass Störungen der PKC-Funktion in NPC1 vorliegen könnten, wird durch die Ergebnisse der Quantifizierung von phosphorylierten PKC-Substraten verstärkt. Jedoch scheint die Störung der PKC in NPC1 über den bisher vermuteten Funktionsverlust hinauszugehen, wie die Präsenz einer Hypophosphorylierung von GluA2 bei gleichzeitiger Hyperphosphorylierung der Summe aller PKC-Substrate zeigt (Walter et al. 2009; Tamari et al. 2013; Peter et al. 2017a). Mit der reduzierten Expression von β III Spektrin konnte zudem ein weiteres zytoskelettales Protein identifiziert werden, welches in NPC1 verändert ist. Dadurch erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur das Wissen um die Pathophysiologie in NPC1, sondern ergänzen auch bisherige Erkenntnisse.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen ob die beschriebenen Unterschiede in der intrinsischen Aktivität von Purkinjezellen, der synaptischen Transmission zu diesen, der zerebellären EAAT-Expression und der PKC-abhängigen Phosphorylierung auf den gleichen molekularen Mechanismen basieren. So ist es vorstellbar, dass eine veränderte PKC-Aktivität zu Veränderungen der inhibitorischen synaptischen Transmission führt, welche Grundlage für die beobachtete chloridabhängige Veränderung der intrinsischen Spontanaktivität ist. Gleichzeitig könnte dies die EAAT-Expression reduzieren und somit die Degeneration der Purkinjezellen induzieren.

Weitere Studien über einen Zusammenhang der hier beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen in NPC1 würden nicht nur deren Ursachen und Vernetzung identifizieren, sondern stellen eine Möglichkeit dar die Wirksamkeit pharmakologischer Intervention z. B. mit PKC-Aktivatoren zu testen und somit die Therapieoption für NPC1-Patienten zu erweitern.

5 Literaturverzeichnis

Abcam (2017): <http://www.abcam.com/protocols/ihc-for-brain-slice-sections-video-protocol>.
Zuletzt geprüft am 05.11.2018.

Alkon, D. L. (2017): Compositions and Methods to Treat Niemann-Pick Disease. Angemeldet
am 27.03.2015. USA. Patentschrift US9833435B2. 05.12.2017.

Amadio, M.; Battaini, F; Pascale, A. (2006): The different facets of protein kinases C: old and
new players in neuronal signal transduction pathways. In: *Pharmacological Research* 54 (5),
S. 317-325.

Anheim, M.; Tranchant, C.; Koenig, M. (2012): The autosomal recessive cerebellar ataxias.
In: *The New England Journal of Medicine* 366 (7), S. 636-646.

Armstrong, D. M.; Ikonovic, M. D.; Sheffield, R.; Wenthold, R. J. (1994):
AMPA-selective glutamate receptor subtype immunoreactivity in the entorhinal cortex of
non-demented elderly and patients with Alzheimer's disease. In: *Brain Research* 639 (2),
S. 207-216.

Avshalumov, Y.; Kirschstein, T.; Lukas, J.; Luo, J.; Wree, A.; Rolfs, A.; Köhling, R. (2012):
Increased excitability and compromised long-term potentiation in the neocortex of NPC1(-/-)
mice. In: *Brain Research* 1444, S. 20-26.

Baglietto-Vargas, D.; Prieto, Gilberto A.; Limon, A.r; Forner, S.; Rodriguez-Ortiz, C. J.;
Ikemura, K. et al. (2018): Impaired AMPA signaling and cytoskeletal alterations induce early
synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Aging Cell*, e12791.

Balakrishnan, S.; Bellamy, T. C. (2009): Depression of parallel and climbing fiber
transmission to Bergmann glia is input specific and correlates with increased precision of
synaptic transmission. In: *Glia* 57 (4), S. 393-401.

Ballatore, C.; Lee, V. M-Y; Trojanowski, J. Q. (2007): Tau-mediated neurodegeneration in
Alzheimer's disease and related disorders. In: *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (9),
S. 663-672.

Bastianelli, E. (2003): Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. In:
Cerebellum (London, England) 2 (4), S. 242-262.

Bergles, D. E.; Dzubay, J. A.; Jahr, C. E. (1997): Glutamate transporter currents in Bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26), S. 14821-14825.

Bird, T. D. (1993): Hereditary Ataxia Overview. In: Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Heather C. Mefford et al. (Hg.): GeneReviews®. Seattle (WA).

Bischofberger, J.; Engel, D.; Li, L.; Geiger, J. R. P.; Jonas, P. (2006): Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. In: *Nature Protocols* 1 (4), S. 2075-2081.

Błaszczak, J. W. (2016): Parkinson's Disease and Neurodegeneration: GABA-Collapse Hypothesis. In *Frontiers in Neuroscience* (1), Artikel. 269.

Bowery, N. G.; Smart, T. G. (2006): GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. In: *British Journal of Pharmacology* 147 Suppl 1, S. 109-119.

Brautigan, R. A.; Eagles, D. A. (1998): Activation of NMDA and non-NMDA receptors by L-aspartate in the suprachiasmatic nucleus of the rat. In: *Cellular Signalling* 10 (2), S. 85-90.

Brorson, J. R.; Manzillo, P. A.; Miller, R.J. (1994): Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. In: *The Journal of Neuroscience* 14 (1), S. 187-197.

Buffo, A.; Rossi, F. (2013): Origin, lineage and function of cerebellar glia. In: *Progress in Neurobiology* 109, S. 42-63.

Byun, K.; Kim, J.; Cho, S-Y.; Hutchinson, B.; Yang, S-R.; Kang, K-S. et al. (2006): Alteration of the glutamate and GABA transporters in the hippocampus of the Niemann-Pick disease, type C mouse using proteomic analysis. In: *Proteomics* 6 (4), S. 1230-1236.

Calhoun, P. (2016): R, R-package "Exact", <https://cran.r-project.org/web/packages/Exact/index.html>. Zuletzt geprüft am 05.11.2018.

Calias, P. (2017): 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrins and the Blood-Brain Barrier: Considerations for Niemann-Pick Disease Type C1. In: *Current Pharmaceutical Design* 23 (40), S. 6231-6238.

Camargo, F.; Erickson, R. P.; Garver, W. S.; Hossain, G. S.; Carbone, P. N.; Heidenreich, R. A.; Blanchard, J. (2001): Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. In: *Life Sciences* 70 (2), S. 131-142.

- Caporali, P.; Bruno, F.; Palladino, G.; Dragotto, J.; Petrosini, L.; Mangia, F. et al. (2016): Developmental delay in motor skill acquisition in Niemann-Pick C1 mice reveals abnormal cerebellar morphogenesis. In: *Acta Neuropathologica Communications* 4 (1), Artikel 94.
- Carter, A. G.; Regehr, W. G. (2000): Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (12), S. 4423-4434.
- Cerminara, N. L.; Rawson, J. A. (2004): Evidence that climbing fibers control an intrinsic spike generator in cerebellar Purkinje cells. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (19), S. 4510-4517.
- Chang, T-Y.; Chang, C. C. Y.; Ohgami, N.; Yamauchi, Y. (2006): Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, S. 129-157.
- Chernoivanenko, I. S.; Matveeva, E. A.; Gelfand, V. I.; Goldman, R. D.; Minin, A. A. (2015): Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. In: *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (3), S. 820-827.
- Chopra R.; Wasserman A. H.; Pulst S. M.; De Zeeuw C. I.; Shakkottai V. G. (2018): Protein kinase C activity is a protective modifier of Purkinje neuron degeneration in cerebellar ataxia. In: *Human Molecular Genetics* 27 (8), S. 1396-1410.
- Chrobak, A. A.; Soltys, Z. (2017): Bergmann Glia, Long-Term Depression, and Autism Spectrum Disorder. In: *Molecular Neurobiology* 54 (2), S. 1156-1166.
- Chung, H. J.; Xia, J.; Scannevin, R. H.; Zhang, X.; Huganir, R. L. (2000): Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluA2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (19), S. 7258-7267.
- Custer, S. K.; Garden, G. A.; Gill, N.; Rueb, U.; Libby, R. T.; Schultz, C. et al. (2006): Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. In: *Nature Neuroscience* 9 (10), S. 1302-1311.
- Cvetanovic, M. (2015): Decreased expression of glutamate transporter GLAST in Bergmann glia is associated with the loss of Purkinje neurons in the spinocerebellar ataxia type 1. In: *Cerebellum (London, England)* 14 (1), S. 8-11.

da Cruz e Silva, O. A. B.; Rebelo, S.; Vieira, S. I.; Gandy, S.; da Cruz e Silva, E. F.; Greengard, P. (2009): Enhanced generation of Alzheimer's amyloid-beta following chronic exposure to phorbol ester correlates with differential effects on alpha and epsilon isozymes of protein kinase C. In: *Journal of Neurochemistry* 108 (2), S. 319-330.

D'Arcangelo, G.; Grossi, D.; Chiara, G. d.; Stefano, M. C. d.; Cortese, G.; Citro, G. et al. (2011): Glutamatergic neurotransmission in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. In: *Brain Research* 1396, S. 11-19.

Davidson, C. D.; Ali, N. F.; Micsenyi, M. C.; Stephey, G.; Renault, S.; Dobrenis, K. et al. (2009): Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. In: *PLoS ONE* 4 (9), e6951.

Dehnes, Y.; Chaudhry, F. A.; Ullensvang, K.; Lehre, K. P.; Storm-Mathisen, J.; Danbolt, N. C. (1998): The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (10), S. 3606-3619.

Divito, C. B.; Underhill, S. M. (2014): Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. In: *Neurochemistry International* 73, S. 172-180.

Dizon, M. J.; Khodakhah, K. (2011): The role of interneurons in shaping Purkinje cell responses in the cerebellar cortex. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (29), S. 10463-10473.

Dorostkar, M. M.; Zou, C.; Blazquez-Llorca, L.; Herms, J. (2015): Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. In: *Acta Neuropathologica* 130 (1), S. 1-19.

Duguid, I. C.; Smart, T. G. (2004): Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. In: *Nature Neuroscience* 7 (5), S. 525-533.

Elrick, M. J.; Pacheco, C. D.; Yu, T.; Dadgar, N.; Shakkottai, V. G.; Ware, C. et al. (2010): Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. In: *Human Molecular Genetics* 19 (5), S. 837-847.

Engbers, J. D. T.; Fernandez, F. R.; Turner, R. W. (2013): Bistability in Purkinje neurons. Ups and downs in cerebellar research. In: *Neural Networks: the Official Journal of the International Neural Network Society* 47, S. 18-31.

Erickson, R. P. (2013): Current controversies in Niemann-Pick C1 disease: steroids or gangliosides; neurons or neurons and glia. In: *Journal of Applied Genetics* 54 (2), S. 215-224.

Etcheberrigaray, R.; Tan, M.; Dewachter, I.; Kuipéri, C.; van der Auwera, I.; Wera, S. et al. (2004): Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30), S. 11141-11146.

Fairman, W. A.; Vandenberg, R. J.; Arriza, J. L.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G. (1995): An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. In: *Nature* 375 (6532), S. 599-603.

Fakler, B.; Jonas, P. (2011): Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, mit Online-Repetitorium*, 31. Auflage. Berlin: Springer, S. 49-75.

Frech, M. J.; **Rabenstein, M.**; Bovensiepen, K.; Rost, S.; Rolfs, A. (2015): Cyclodextrin Alters GABAergic Input to CA1 Pyramidal Cells in Wild-Type But Not in NPC1-Deficient Mice. In: *BioResearch Open Access* 4 (1), S. 358-362.

Fukutani, Y.; Cairns, N. J.; Rossor, M. N.; Lantos, P. L. (1996): Purkinje cell loss and astrogliosis in the cerebellum in familial and sporadic Alzheimer's disease. In: *Neuroscience Letters* 214 (1), S. 33-36.

Garthwaite G.; Garthwaite J. (1991a): AMPA Neurotoxicity in Rat Cerebellar and Hippocampal Slices: Histological Evidence for Three Mechanisms. In: *European Journal of Neuroscience* 3 (8), S. 715-728.

Garthwaite G.; Garthwaite J. (1991b): AMPA Neurotoxicity in Rat Cerebellar and Hippocampal Slices: Histological Evidence for Three Mechanisms. In: *European Journal of Neuroscience* 3 (8), S. 729-736.

Gincel, D.; Regan, M. R.; Jin, L.; Watkins, A. M.; Bergles, D. E.; Rothstein, J. D. (2007): Analysis of cerebellar Purkinje cells using EAAT4 glutamate transporter promoter reporter in mice generated via bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. In: *Experimental Neurology* 203 (1), S. 205-212.

Häusser M.; Clark B. A. (1997): Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. In: *Neuron* 19 (3), S. 665-678.

Hansra, G.; Garcia-Paramio, P.; Prevostel, C.; Whelan, R. D.; Bornancin, F.; Parker, P. J. (1999): Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isoforms. In: *The Biochemical Journal* 342 (Pt 2), S. 337-344.

Hastie, P.; Henley, J. M. (2009): AMPA receptor cell biology/trafficking. In: Larry R. Squire (Hg.): *Encyclopedia of Neuroscience*. London: Academic Elsevier, S. 295–302.

Hawkes, R. B. (2001): Cerebellum: Anatomy and Organization. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Helquist, P.; Maxfield, F. R.; Wiech, N. L.; Wiest, O. (2013): Treatment of Niemann-pick type C disease by histone deacetylase inhibitors. In: *Neurotherapeutics: the Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* 10 (4), S. 688-697.

Henley J. M.; Wilkinson K. A. (2016): Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. In: *Nature Reviews Neuroscience* 17 (6), S. 337-350.

Higashi, Y.; Murayama, S.; Pentchev, P. G.; Suzuki, K. (1993): Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse. In: *Acta Neuropathologica* 85 (2), S. 175-184.

Holmes, G. L. (1995): Role of glutamate and GABA in the pathophysiology of epilepsy. In: *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 1 (3), S. 208-219.

Hongpaisan, J.; Sun, M.-K.; Alkon, D. L. (2011): PKC ϵ activation prevents synaptic loss, A β elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (2), S. 630-643.

Hourez, R.; Servais, L.; Orduz, D.; Gall, D.; Millard, I.; Kerchoue d'Exaerde, A. d. et al. (2011): Aminopyridines correct early dysfunction and delay neurodegeneration in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (33), S. 11795-11807.

Huang, C. M.; Huang, R. H. (1998): Measuring parallel fiber length in the rat cerebellum. In: *Brain Research* 801 (1-2), S. 211-215.

- Huang, H.; Bordey, A. (2004): Glial glutamate transporters limit spillover activation of presynaptic NMDA receptors and influence synaptic inhibition of Purkinje neurons. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (25), S. 5659-5669.
- Huang, M.; Verbeek, D. S. (2018): Why do so many genetic insults lead to Purkinje Cell degeneration and spinocerebellar ataxia? In: *Neuroscience Letters* 688, S. 49-57.
- Huppelsberg, J.; Walter, K. (2005): *Kurzlehrbuch Physiologie. Nach dem neuen GK 1]* ; 42 Tabellen. 2., korr. Aufl. Stuttgart: Thieme. S. 309-313.
- Hurlock, E. C.; McMahon, A.; Joho, R. H. (2008): Purkinje-cell-restricted restoration of Kv3.3 function restores complex spikes and rescues motor coordination in Kcnc3 mutants. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (18), S. 4640-4648.
- Ikonomovic, M. D.; Mizukami, K.; Davies, P.; Hamilton, R.; Sheffield, R.; Armstrong, D. M. (1997): The loss of GluR2(3) immunoreactivity precedes neurofibrillary tangle formation in the entorhinal cortex and hippocampus of Alzheimer brains. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 (9), S. 1018-1027.
- Isa, T.; Iino, M.; Itazawa, S.; Ozawa, S. (1995): Spermine mediates inward rectification of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels. In: *Neuroreport* 6 (15), S. 2045-2048.
- Isaac, J.T. R.; Ashby, M. C.; McBain, C. J. (2007): The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. In: *Neuron* 54 (6), S. 859-871.
- Ishida, Y.; Kawakami, H.; Kitajima, H.; Nishiyama, A.; Sasai, Y.; Inoue, H.; Muguruma, K. (2016): Vulnerability of Purkinje Cells Generated from Spinocerebellar Ataxia Type 6 Patient-Derived iPSCs. In: *Cell Reports* 17 (6), S. 1482-1490.
- Jackson, J. G.; O'Donnell, J. C.; Takano, H.; Coulter, D. A.; Robinson, M. B. (2014): Neuronal activity and glutamate uptake decrease mitochondrial mobility in astrocytes and position mitochondria near glutamate transporters. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (5), S. 1613-1624.
- Karten B.; Campenot R. B.; Vance D. E.; Vance J. E. (2006): The Niemann-Pick C1 protein in recycling endosomes of presynaptic nerve terminals. In: *Journal of Lipid Research* 47 (3), S. 504-514.

- Karten, B.; Vance, D. E.; Campenot, R. B.; Vance, J. E. (2003): Trafficking of cholesterol from cell bodies to distal axons in Niemann Pick C1-deficient neurons. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (6), S. 4168-4175.
- Kasumu, A.; Bezprozvanny, I. (2012): Deranged calcium signaling in Purkinje cells and pathogenesis in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) and other ataxias. In: *Cerebellum (London, England)* 11 (3), S. 630-639.
- Kasumu, A. W.; Hougaard, C.; Rode, F.; Jacobsen, T. A.; Sabatier, J. M.; Eriksen, B. L. et al. (2012a): Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2. In: *Chemistry & Biology* 19 (10), S. 1340-1353.
- Kasumu, A. W.; Liang, X.; Egorova, P.; Vorontsova, D.; Bezprozvanny, I. (2012b): Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (37), S. 12786-12796.
- Kawahara, M.; Arispe, N.; Kuroda, Y.; Rojas, E. (1997): Alzheimer's disease amyloid beta-protein forms Zn(2+)-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. In: *Biophysical Journal* 73 (1), S. 67-75.
- Keck, G. E.; Poudel, Y. B.; Rudra, A.; Stephens, J. C.; Kedei, N.; Lewin, N. E.; Blumberg, P. M. (2012): Role of the C8 gem-dimethyl group of bryostatin 1 on its unique pattern of biological activity. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (12), S. 4084-4088.
- Kedei, N.; Telek, A.; Michalowski, A. M.; Kraft, M. B.; Li, W.; Poudel, Y. B. et al. (2013): Comparison of transcriptional response to phorbol ester, bryostatin 1, and bryostatin analogs in LNCaP and U937 cancer cell lines provides insight into their differential mechanism of action. In: *Biochemical Pharmacology* 85 (3), S. 313-324.
- Khan, T. K.; Sen, A.; Hongpaisan, J.; Lim, C. S.; Nelson, T. J.; Alkon, D. L. (2015): PKC ϵ deficits in Alzheimer's disease brains and skin fibroblasts. In: *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 43 (2), S. 491-509.
- Kitamura, K.; Kano, M. (2013): Dendritic calcium signaling in cerebellar Purkinje cell. In: *Neural Networks: the Official Journal of the International Neural Network Society* 47, S. 11-17.

- Knobloch, M.; Mansuy, I. M. (2008): Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. In: *Molecular Neurobiology* 37 (1), S. 73-82.
- Ko, D. C.; Milenkovic, L.; Beier, S. M.; Manuel, H., Buchanan, J., Scott, M.P. (2005): Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. In: *PLoS Genetics* 1 (1), S. 81-95.
- Koike, M.; Iino, M.; Ozawa, S. (1997): Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca(2+)-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. In: *Neuroscience Research* 29 (1), S. 27-36.
- Leduc, V.; Jasmin-Bélanger, S.; Poirier, J. (2010): APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. In: *Trends in Molecular Medicine* 16 (10), S. 469-477.
- Lee, H-K. (2012): Ca-permeable AMPA receptors in homeostatic synaptic plasticity. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, Artikel 17.
- Lehmann-Horn, F. (2011): Motorische Systeme. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, mit Online-Repetitorium*, 31. Auflage. Berlin: Springer, S. 128-162.
- Lin, X.; Antalffy, B.; Kang, D.; Orr, H. T.; Zoghbi, H. Y. (2000): Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. In: *Nature Neuroscience* 3 (2), S. 157-163.
- Liu, B.; Ramirez, C. M.; Miller, A. M.; Repa, J. J.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M. (2010a): Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. In: *Journal of Lipid Research* 51 (5), S. 933-944.
- Liu, J-P.; Tang, Y.; Zhou, S.; Toh, B. H.; McLean, C.; Li, H. (2010b): Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* 43 (1), S. 33-42.
- Liu, S. Q.; Cull-Candy, S. G. (2000): Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. In: *Nature* 405 (6785), S. 454-458.
- Liu, S-J.; Gasperini, R.; Foa, L.; Small, D. H. (2010c): Amyloid-beta decreases cell-surface AMPA receptors by increasing intracellular calcium and phosphorylation of GluR2. In: *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 21 (2), S. 655-666.

- Liu, S. J.; Cull-Candy, S. G. (2005): Subunit interaction with PICK and GRIP controls Ca²⁺ permeability of AMPARs at cerebellar synapses. In: *Nature Neuroscience* 8 (6), S. 768-775.
- Liu, S. J.; Lachamp, P. (2006): The activation of excitatory glutamate receptors evokes a long-lasting increase in the release of GABA from cerebellar stellate cells. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (36), S. 9332-9339.
- Liu, S. J.; Zukin, R. S. (2007): Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. In: *Trends in Neurosciences* 30 (3), S. 126-134.
- Lloyd-Evans, E.; Platt, F. M. (2010): Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (4), S. 419-428.
- Loftus, S. K. (1997): Murine Model of Niemann-Pick C Disease. Mutation in a Cholesterol Homeostasis Gene. In: *Science* 277 (5323), S. 232-235.
- López-Doménech, G.; Higgs, N. F.; Vaccaro, V.; Roš, H.; Arancibia-Cárcamo, I. L.; MacAskill, A. F.; Kittler, J. T. (2016): Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites. In: *Cell Reports* 17 (2), S. 317-327.
- Lynch, G. (2002): Memory enhancement: the search for mechanism-based drugs. In: *Nature Neuroscience* 5 Suppl, S. 1035-1038.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2014): Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease type C. In: *Drugs* 74 (1), S. 61-74.
- Mansouri, M.; Berger, P. (2018): Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. In: *Plasmid* 98, S. 1-7.
- Marschalek, N.; Albert, F.; Meske, V.; Ohm, T. G. (2014): The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored in vitro. In: *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40 (7), S. 933-945.
- Martini, F. H.; Timmons, M. J.; Tallitsch, R. B. (2013): Anatomie Kompaktlehrbuch. 6., aktualisierte Aufl. München: Pearson (Always learning, 4198). S. 535-537.
- Masoli, S.; Solinas, S.; D'Angelo, E. (2015): Action potential processing in a detailed Purkinje cell model reveals a critical role for axonal compartmentalization. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, Artikel 47.

- Matsuda, S.; Launey, T.; Mikawa, S.; Hirai, H. (2000): Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. In: *The EMBO Journal* 19 (12), S. 2765-2774.
- Matsuda, S.; Mikawa, S.; Hirai, H. (1999): Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. In: *Journal of Neurochemistry* 73 (4), S. 1765-1768.
- Maue, R. A.; Burgess, R. W.; Wang, B.; Wooley, C. M.; Seburn K. L.; Vanier, M. T. et al. (2012): A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. In: *Human Molecular Genetics* 21 (4), S. 730-750.
- Maxfield, F. R.; Wüstner, D. (2002): Intracellular cholesterol transport. In: *The Journal of Clinical Investigation* 110 (7), S. 891-898.
- McCauliff, L. A.; Xu, Z.; Storch, J. (2011): Sterol transfer between cyclodextrin and membranes: similar but not identical mechanism to NPC2-mediated cholesterol transfer. In: *Biochemistry* 50 (34), S. 7341-7349.
- Melcangi, R. C.; Giatti, S.; Calabrese, D.; Pesaresi, M.; Cermenati, G.; Mitro, N. et al. (2014): Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. In: *Progress in Neurobiology* 113, S. 56-69.
- Mittmann, W.; Koch, U.; Häusser, M. (2005): Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. In: *The Journal of Physiology* 563 (Pt 2), S. 369-378.
- Molleman, A. (2005): Patch clamping. An introductory guide to patch clamp electrophysiology. Reprint. Chichester: Wiley. S.123-125.
- Myant, N.B. (1973): Cholesterol metabolism. In: *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)* 5, S. 1-4.
- Napper, R. M.; Harvey, R. J. (1988): Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. In: *The Journal of Comparative Neurology* 274 (2), S. 168-177.
- Nelson, T. J.; Alkon, D. L. (2009): Neuroprotective versus tumorigenic protein kinase C activators. In: *Trends in Biochemical Sciences* 34 (3), S. 136-145.

Nelson, T. J.; Sun, M-K.; Lim, C.; Sen, A.; Khan, T.; Chirila, F. V.; Alkon, D. L. (2017): Bryostatins Effects on Cognitive Function and PKC ϵ in Alzheimer's Disease Phase IIa and Expanded Access Trials. In: *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 58 (2), S. 521-535.

Neurotrope Bioscience; The Mount Sinai Hospital (2017): Methods and compositions for treatment of lipid storage disorders. Erfinder: Ioannou, Y. A.; Altstiel, L.; Crockford, D. R.; Kongsamut, S.. Angemeldet am 14.04.2015. USA. Patentschrift US9724328B2. 08.08.2017.

Newton, A. C. (2010): Protein kinase C: poised to signal. In: *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298 (3), E395-402.

Orth, M.; Bellosta, S. (2012): Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. In: *Cholesterol* 2012, ID 292598.

Paulson, H. L. (2009): The spinocerebellar ataxias. In: *Journal of Neuro-Ophthalmology: the Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 29 (3), S. 227-237.

Peake, K. B.; Vance, J. E. (2010): Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. In: *FEBS Letters* 584 (13), S. 2731-2739.

Perkins, E.; Suminaite, D.; Jackson, M. (2016a): Cerebellar ataxias: β -III spectrin's interactions suggest common pathogenic pathways. In: *The Journal of Physiology* 594 (16), S. 4661-4676.

Perkins, E. M.; Clarkson, Y. L.; Sabatier, N.; Longhurst, D. M.; Millward, C. P.; Jack, J. et al. (2010): Loss of beta-III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behavior and neuropathology of spinocerebellar ataxia type 5 in humans. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (14), S. 4857-4867.

Perkins, E. M.; Clarkson, Y. L.; Suminaite, D.; Lyndon, A. R.; Tanaka, K.; Rothstein, J. D. et al. (2018): Loss of cerebellar glutamate transporters EAAT4 and GLAST differentially affects the spontaneous firing pattern and survival of Purkinje cells. In: *Human Molecular Genetics*.

Perkins, E. M.; Suminaite, D.; Clarkson, Y. L.; Lee, S. K.; Lyndon, A. R.; Rothstein, J. D. et al. (2016b): Posterior cerebellar Purkinje cells in an SCA5/SPARCA1 mouse model are especially vulnerable to the synergistic effect of loss of β -III spectrin and GLAST. In: *Human Molecular Genetics* 25 (20), S. 4448-4461.

Peter, F.; Rost, S.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017a): Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12 (1), S. 145.

- Peter, F.; Trilck, M.; **Rabenstein, M.**; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017b): Dataset in support of the generation of Niemann-Pick disease Type C1 patient-specific iPSC cell lines carrying the novel NPC1 mutation c.1180TC or the prevalent c.3182TC mutation - Analysis of pluripotency and neuronal differentiation. In: *Data in Brief* 12, S. 123-131.
- Popugaeva, E.; Pchitskaya, E.; Bezprozvanny, I. (2017): Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483 (4), S. 998-1004.
- Rabenstein, M.**; Peter, F.; Joost, S.; Trilck, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017): Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* 83, S. 27-36.
- Raman, I. M.; Bean, B. P. (1999): Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (5), S. 1663-1674.
- Reichenbach, A.; Siegel, A.; Rickmann, M.; Wolff, J. R.; Noone, D.; Robinson, S. R. (1995): Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. In: *Journal für Hirnforschung* 36 (4), S. 509-517.
- Reid, P. C.; Sakashita, N.; Sugii, S.; Ohno-Iwashita, Y.; Shimada, Y.; Hickey, W. F.; Chang, T-Y. (2004): A novel cholesterol stain reveals early neuronal cholesterol accumulation in the Niemann-Pick type C1 mouse brain. In: *Journal of Lipid Research* 45 (3), S. 582-591.
- Rogers, S. L.; Gelfand, V. I. (2000): Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. In: *Current Opinion in Cell Biology* 12 (1), S. 57-62.
- Rudolph, R.; Jahn, H. M.; Courjaret, R.; Messemer, N.; Kirchhoff, F.; Deitmer, J. W. (2016): The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling. In: *Glia* 64 (7), S. 1265-1280.
- Sakai, N.; Saito, N.; Seki, T. (2011): Molecular pathophysiology of neurodegenerative disease caused by γ PKC mutations. In: *The World Journal of Biological Psychiatry: the Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 12 Suppl 1, S. 95-98.
- Santos-Lozano, A.; Villamandos García, D.; Sanchis-Gomar, F.; Fiuza-Luces, C.; Pareja-Galeano, H.; Garatachea, N. et al. (2015): Niemann-Pick disease treatment: a systematic review of clinical trials. In: *Annals of Translational Medicine* 3 (22), S. 360.

Sarna, J. R.; Hawkes, R. (2003): Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. In: *Progress in Neurobiology* 70 (6), S. 473-507.

Sarna, J. R.; Larouche, M.; Marzban, H.; Sillitoe, R. V.; Rancourt, D. E.; Hawkes, R. (2003): Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. In: *The Journal of Comparative Neurology* 456 (3), S. 279-291.

Savtchouk, I.; Liu, S. J. (2011): Remodeling of synaptic AMPA receptor subtype alters the probability and pattern of action potential firing. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (2), S. 501-511.

Serra, H. G.; Byam, C. E.; Lande, J. D.; Tousey, S. K.; Zoghbi, H. Y.; Orr, H. T. (2004): Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. In: *Human Molecular Genetics* 13 (20), S. 2535-2543.

Shakkottai, V. G.; Xiao, M.; Xu, L.; Wong, M.; Nerbonne, J. M.; Ornitz, D. M. et al. (2009): FGF14 regulates the intrinsic excitability of cerebellar Purkinje neurons. In: *Neurobiology of Disease* 33 (1), S. 81-88.

Shakkottai, V. G.; do Carmo Costa, M.; Dell'Orco, J. M.; Sankaranarayanan, A.; Wulff, H.; Paulson, H. L. (2011): Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (36), S. 13002-13014.

Slemmer, J. E.; Haasdijk, E. D.; Engel, D. C.; Plesnila, N.; Weber, J. T. (2007): Aldolase C-positive cerebellar Purkinje cells are resistant to delayed death after cerebral trauma and AMPA-mediated excitotoxicity. In: *The European Journal of Neuroscience* 26 (3), S. 649-656.

Spruston, N.; Johnston, D. (2008): Out of control in the dendrites. In: *Nature Neuroscience* 11 (7), S. 733-734.

Su, L-D.; Shen, Y. (2009): Blockade of glutamate transporters facilitates cerebellar synaptic long-term depression. In: *Neuroreport* 20 (5), S. 502-507.

Sun, C-L.; Su, L-D.; Li, Q.; Wang, X-X.; Shen, Y. (2011): Cerebellar long-term depression is deficient in Niemann-Pick type C disease mice. In: *Cerebellum (London, England)* 10 (1), S. 88-95.

- Sun, L.; June Liu, S. (2007): Activation of extrasynaptic NMDA receptors induces a PKC-dependent switch in AMPA receptor subtypes in mouse cerebellar stellate cells. In: *The Journal of Physiology* 583 (Pt 2), S. 537-553.
- Szallasi, Z.; Smith, C. B.; Pettit, G. R.; Blumberg, P. M. (1994): Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (3), S. 2118-2124.
- Tada, M.; Nishizawa, M.; Onodera, O. (2015): Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent research on cerebellar systems. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 86 (8), S. 922-928.
- Takayasu, Y.; Iino, M.; Takatsuru, Y.; Tanaka, K.; Ozawa, S. (2009): Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. In: *Acta Physiologica (Oxford, England)* 197 (1), S. 1-12.
- Tamari, F.; Chen, F. W.; Li, C.; Chaudhari, J.; Ioannou, Y. A. (2013): PKC activation in Niemann pick C1 cells restores subcellular cholesterol transport. In: *PLoS ONE* 8 (8), e74169.
- Tang, Y.; Li, H.; Liu, J-P. (2010): Niemann-Pick Disease Type C: from molecule to clinic. In: *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 37 (1), S. 132-140.
- The Jackson Laboratory (2017): Genotyping Protocol by Separated PCR for Balb/cNctr NPC1m1N/J mice, version 2.3. The Jackson Laboratory. Online verfügbar unter https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:22869,003092, zuletzt aktualisiert am 19.05.2017. Zuletzt geprüft am 11.10.2018.
- Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K. et al. (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. In: *Pharmacological Reviews* 62 (3), S. 405-496.
- Trilck, M.; Hübner, R.; Seibler, P.; Klein, C.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2013): Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8, S. 144.
- Trilck, M.; Peter, F.; Zheng, C.; Frank, M.; Dobrenis, K.; Mascher, H. et al. (2017): Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. In: *Brain Research* 1657, S. 52-61.

Trindade-Silva, A. E.; Lim-Fong, G. E.; Sharp, K. H.; Haygood, M. G. (2010): Bryostatins: biological context and biotechnological prospects. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (6), S. 834-842.

Trotti, D.; Gibb, S. L. (2005): Glutamate Transporters. In: Anthony E. Lang, Albert C. Ludolph und M. Flint Beal (Hg.): *Neurodegenerative Diseases. Neurobiology, Pathogenesis, and Therapeutics*. Cambridge: Cambridge University Press, S. 57-64.

Tsukada, S.; Ino, M.; Takayasu, Y.; Shimamoto, K.; Ozawa, S. (2005): Effects of a novel glutamate transporter blocker, (2S, 3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA), on activities of hippocampal neurons. In: *Neuropharmacology* 48 (4), S. 479-491.

Tzingounis, A. V.; Wadiche, J. I. (2007): Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. In: *Nature Reviews Neuroscience* 8 (12), S. 935-947.

Untiet, V.; Kovermann, P.; Gerkau, N. J.; Gensch, T.; Rose, C. R.; Fahlke, C. (2016): Glutamate transporter-associated anion channels adjust intracellular chloride concentrations during glial maturation. In: *Glia* 65 (2), S. 388-400.

van Beugen, B. J.; Qiao, X.; Simmons, D. H.; Zeeuw, C. I. de; Hansel, C. (2014): Enhanced AMPA receptor function promotes cerebellar long-term depression rather than potentiation. In: *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 21 (12), S. 662-667.

Vanier, M. T.; Suzuki, K. (1998): Recent advances in elucidating Niemann-Pick C disease. In: *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8 (1), S. 163-174.

Vanier, M. T. (2010): Niemann-Pick disease type C. In: *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5, Artikel 16.

Veruki, M. L.; Mørkve, S. H.; Hartveit, E. (2006): Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. In: *Nature Neuroscience* 9 (11), S. 1388-1396.

Walter, J. T.; Alviña, K.; Womack, M. D.; Chevez, C.; Khodakhah, K. (2006): Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. In: *Nature Neuroscience* 9 (3), S. 389-397.

- Walter, M.; Chen, F. W.; Tamari, F.; Wang, R.; Ioannou, Y. A. (2009): Endosomal lipid accumulation in NPC1 leads to inhibition of PKC, hypophosphorylation of vimentin and Rab9 entrapment. In: *Biology of the Cell* 101 (3), S. 141-152.
- Wang, S.; Wang, B.; Pan, N.; Fu, L.; Wang, C.; Song, G. et al. (2015): Differentiation of human induced pluripotent stem cells to mature functional Purkinje neurons. In: *Scientific Reports* 5, Artikel 9232.
- Wasser, C. R.; Ertunc, M.; Liu, X.; Kavalali, E. T. (2007): Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. In: *The Journal of Physiology* 579 (Pt 2), S. 413-429.
- Watson, L. M.; Wong, M. M. K.; Vowles, J.; Cowley, S. A.; Becker, E. B. E. (2018): A Simplified Method for Generating Purkinje Cells from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Cerebellum (London, England)* 17 (4), S. 419-427.
- Welsh, J. P.; Yuen, G.; Placantonakis, D. G.; Vu, T. Q.; Haiss, F.; O'Hearn, E. et al. (2002): Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. In: *Advances in Neurology* 89, S. 331-359.
- Widagdo, J.; Chai, Y. J.; Ridder, M. C.; Chau, Y. Q.; Johnson, R. C.; Sah, P. et al. (2015): Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. In: *Cell Reports* 10 (5), S. 783-795.
- Witters, L.; Rudolph, S.; Pressler, R. T.; Lahlaf, S. I.; Regehr, W. G. (2016): Purkinje cell collaterals enable output signals from the cerebellar cortex to feed back Purkinje cells and interneurons. In: *Neuron* 91 (2), S. 312-319.
- Womack, M.; Khodakhah, K. (2002): Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. In: *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (24), S. 10603-10612.
- Wong, M. M. K.; Watson, L. M.; Becker, E. B. E. (2017): Recent advances in modelling of cerebellar ataxia using induced pluripotent stem cells. In: *Journal of Neurology & Neuromedicine* 2 (7), S. 11-15.
- Woś, M.; Szczepanowska, J.; Pikuła, S.; Tyłki-Szymańska, A.; Zabłocki, K.; Bandorowicz-Pikuła, J. (2016): Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 593, S. 50-59.

- Yang, D.; Tao, J.; Li, Luowei; K., Noemi; T., Zsuzsanna E.; Czap, A. et al. (2011): RasGRP3, a Ras activator, contributes to signaling and the tumorigenic phenotype in human melanoma. In: *Oncogene* 30 (45), S. 4590-4600.
- Yu, T.; Lieberman, A. P. (2013): Npc1 acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin. In: *PLoS Genetics* 9 (4), e1003462.
- Yu, T.; Shakkottai, V. G.; Chung, C.; Lieberman, A. P. (2011): Temporal and cell-specific deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration. In: *Human Molecular Genetics* 20 (22), S. 4440-4451.
- Yu, W.; Gong, J-S.; Ko, M.; Garver, W. S.; Yanagisawa, K.; Michikawa, M. (2005): Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (12), S. 11731-11739.
- Yuan, Q.; Qiu, D-L.; Weber, J. T.; Hansel, C.; Knöpfel, T. (2007): Climbing fiber-triggered metabotropic slow potentials enhance dendritic calcium transients and simple spike firing in cerebellar Purkinje cells. In: *Molecular and Cellular Neurosciences* 35 (4), S. 596-603.
- Zhou, H.; Lin, Z.; Voges, K.; Ju, C.; Gao, Z.; Bosman, L. W. J. et al. (2014): Cerebellar modules operate at different frequencies. In: *eLife* 3, e02536.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
Bzw.	Beziehungsweise
CA1	<i>Cornu ammonis</i> 1
Calbindin	Calbindin D28K
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAAT	Excitatory amino acid transporter (Transporter exzitatorischer Aminosäuren)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E _{GG}	Gleichgewichtspotential
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
EPSC	Excitatory postsynaptic current (erregender postsynaptischer Strom)
et al.	et alia (und andere)
EXS-Carbogen	Extrazellulärlösung (Extracellular solution), gepuffert mit Bicarbonat/Carbogen
EXS-HEPES	Extrazellulärlösung (Extracellular solution), gepuffert mit HEPES
GABA	Gamma-aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
GluA	Untereinheit des AMPA-Rezeptors
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
INK-High	Intrazellulärlösung mit hoher Chloridkonzentration
INK-IPSC	Intrazellulärlösung für die IPSC-Messungen
INK-Phys	Intrazellulärlösung mit physiologischer Chloridkonzentration
IPSC	Inhibitory postsynaptic current (inhibierender postsynaptischer Strom)
iPSZ	Induzierte pluripotente Stammzellen
KMAA	Koeffizient der mittleren Aktionspotentialabständen
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein niederer Dichte)

LTD	Long-term depression (Langzeitdepression)
LTP	Long-term potentiation (Langzeitpotentierung)
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NDZ	Neuronal differenzierte Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPC	Morbus Niemann-Pick Typ C
NPC1	Morbus Niemann-Pick Typ C1
NPC1 ^{+/+}	NPC1-Wildtyp
NPC1 ^{+/-}	NPC1-Heterozygot
NPC1 ^{-/-}	NPC1-defizient
p[Zahl]	Postnataler Tag [Zahl]; [Zahl] Tage nach Geburt
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
Phys.	physiologisch
PK	Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSC	Postsynaptic current (postsynaptischer Strom)
P-Ser	phosphoryliertes Serin
P-Ser880-GluA2	Ser880-phosphoryliertes GluA2
SCA	Spinocerebelläre Ataxie (spinozerebelläre Ataxie)
Ser	Serin
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBOA	DL- Threo-beta-benzyloxyaspartat
TBS	Tris-buffered saline (Trisgepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-buffered saline (Trisgepufferte Salzlösung) mit Tween® 20
TTX	Tetrodotoxin
V _M	Membranpotential
vs.	versus (gegen)
z. B.	zum Beispiel

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Primärantikörper	99
Tab. 2	Verwendete Sekundärantikörper	99
Tab. 3	Verwendete PCR-Primer.....	99
Tab. 4	Verwendete Verbrauchsmaterialien	100
Tab. 5	Verwendete Chemikalien	101
Tab. 6	Verwendete Geräte	102
Tab. 7	Verwendete Software	102
Tab. 8	Programm 009 des DMZ Universalpullers.	103
Tab. 9	Umkehrpotentiale der Ionen in Abhängigkeit von Pufferkombination und Temperatur ..	103
Tab. 10	Aktivitätsmustersverteilung	103
Tab. 11	Frequenzen und Koeffizienten der mittleren Aktionspotentialabständen (KMAA) tonisch aktiver Purkinjezellen.....	103
Tab. 12	Aktivitätsmuster veränderter Effekt von TBOA	103
Tab. 13	Gleichgewichtspotentiale	104
Tab. 14	Einfluss von L-Aspartat auf das Gleichgewichtspotential	104
Tab. 15	IPSC Frequenzen.....	104
Tab. 16	IPSC Frequenzerhöhung durch NMDA	104
Tab. 17	Ausmaß der IPSC Frequenzerhöhung durch NMDA.....	104
Tab. 18	Western Blot.....	105
Tab. 19	Anteil von P-Ser880-GluA2 an totaler GluA2 Menge.....	105

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Cholesterol als strukturelles Element in Neuronen.	7
Abb. 2 Cholesterolaufnahme (1) und Transport (2) in gesunden und NPC1- bzw. NPC2-defizienten Zellen.	8
Abb. 3 Anatomie des Kleinhirns.	10
Abb. 4 Aufbau und synaptische Verschaltung der Kleinhirnrinde.	12
Abb. 5 Trimodale Purkinjzellaktivität.	12
Abb. 6 Ionenkanäle und deren Lokalisation in einem Computermodell der Aktionspotentialgenerierung von Purkinjzellen.	13
Abb. 7 Synaptischer Einfluss auf die Purkinjzellaktivität.	14
Abb. 8 Dreiteilige Synapsen an Purkinjzellen.	16
Abb. 9 Purkinjzelldegeneration in p60 NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	18
Abb. 10 Ergebnis einer Genotypisierung.	22
Abb. 11 Stromantworten einer Purkinjzelle auf ein Spannungssprungprotokoll.	24
Abb. 12 Purkinjzelldegeneration in NPC ^{-/-} -Mäusen.	32
Abb. 13 Intakte Dendritenbäume von Purkinjzellen in parasagittalen Schnitten des Kleinhirnwurms von NPC1 ^{+/+} - und NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	33
Abb. 14 Purkinjzellen weisen unterschiedliche Aktionspotentialaktivitätsmuster auf.	34
Abb. 15 Chloridabhängige Veränderung der Purkinjzellaktivitätsmuster in NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	36
Abb. 16 DL-TBOA-Applikation induzierte Veränderungen im Aktivitätsmuster von Purkinjzellen abhängig vom Genotyp und der intrazellulären Chloridkonzentration.	37
Abb. 17 Unterschiedliche Effekte der Applikation von TBOA auf die Purkinjzellaktivität.	38
Abb. 18 Verschiebung des Gleichgewichtspotentials durch eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren.	39
Abb. 19 Kein Unterschied im Gleichgewichtspotential von Purkinjzellen von NPC1 ^{+/+} - und NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	40
Abb. 20 Auswirkung von L-Aspartat auf das Gleichgewichtspotential.	41
Abb. 21 Reduzierte Expression von Glutamatransportern in NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	43
Abb. 22 Messung von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSC).	45
Abb. 23 Erhöhte IPSC-Frequenz in Purkinjzellen von NPC1 ^{-/-} -Mäusen.	46
Abb. 24 Der Effekt von NMDA ist in Purkinjzellen von NPC1 ^{-/-} -Mäusen reduziert.	46
Abb. 25 PKC abhängige Hyperphosphorylierung in p55 NPC ^{-/-} -Mäusen.	48
Abb. 26 Reduzierte Expression von Ser880-phosphorylierten GluA2 in NPC ^{-/-} -Mäusen.	49

9 Anhänge

9.1 Verwendete Antikörper, PCR-Primer, Materialien, Chemikalien, Geräte und Software

Tab. 1 Verwendete Primärantikörper

GluR2 = GluA2

Antigen	Wirt	Klonalität	Methode	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Calbindin d28k	Huhn	Poly	Immunfluoreszenz	1:500	Synaptic Systems, Göttingen, DE	214006
Calbindin d28k (D-4)	Maus	Mono	Western Blot	1:500	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-365360
EAAT1 (GLAST)	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:5000	Proteintech, Rosemont, USA	20785-1-AP
EAAT2 (H-85)	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:1000	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-15317
EAAT4	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:1000	Proteintech, Rosemont, USA	12876-1-AP
GluR2 (N-19)	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-7611
P-Ser880-GluR2	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:1500	Abcam, Cambridge, GB	ab52180
P-Ser-PKC-Substrat	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	#2261
β-Aktin	Maus	Mono	Western Blot	1:10.000	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE	A5441
βIII Spektrin	Kaninchen	Poly	Western Blot	1:2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	PA1-46007

Tab. 2 Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Antigen	Methode	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Alexa Fluor 488	Ziege	Huhn-IgG	Immunfluoreszenz	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A-11039
IRDye® 680LT	Ziege	Kaninchen-IgG	Western Blot	1:10.000	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA	926-68021
IRDye800®	Ziege	Maus-IgG	Western Blot	1:10.000	Rockland Immunochemicals, Pottstown, USA	610-132-121

Tab. 3 Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Länge (Bp)	Hersteller
NPC1-KO Frw	TGAGCCCAAGCATAACTTCC	20	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
NPC1-KO Rev	GGTGCTGGACAGCCAAGTA	19	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
NPC1-WT Frw	CTGTAGCTCATCTGCCATCG	20	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
NPC1-WT Rev	TCTCACAGCCACAAGCTTCC	20	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

Tab. 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Criterion™ Precast Gel (4-15% TRIS-HCl)	Bio Rad Laboratories, München, DE
Deckgläser	Krupmholz, Delters, DE
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, 3 ml unsteril	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Exadrop® Präzisions-Tropfenregler für Schwerkraftinfusionen	B. Braun Melsungen, Melsungen, DE
Filterpapier	Machery-Nagel, Düren, DE
Glaskapillaren „GC150F-10“	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Microloader 20 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Micromanifold® QMM-8/1WT, Spülkanal: 200 µm ID	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
Pipettenspitzen 10 µl; 200 µl, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht, DE
Rasierklingen Wilkinson Sword Classic	Wilkinson Sword, Solingen, DE
Reaktionsgefäße „SafeSeal Tubes 1,5 ml und 2 ml“	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Röhrchen 15 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DE
Röhrchen 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, DE
Trans-Blot® Turbo™ Nitrocellulose Transfer Packs	Bio Rad Laboratories, München, DE
Tygon E3603 Schlauch	Saint-Gobain Performance Plastics France, Charny, FR
Whatman™ GB 005 Gel blotting paper	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB

Tab. 5 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer	CAS
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, USA	N3231	---
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	A2383	34369-07-8
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, DE	A512.1	34725-61-6
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	8076.4	90604-29-8
Cadmiumchlorid Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	529575	654054-66-7
Carbogen (5 % CO ₂ in O ₂)	Werk DEF2, Krefeld-Gellep, DE	---	---
Cäsiumhydroxid	Thermofisher Acros Organics, Geel, BE	213601000	21351-79-1
complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim, DE	04693124001	---
D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt, DE	1.08342.1000	14431-43-7
DAPI (4'6-Diamidin-2-Phenylindol)	Life Technologies, Carlsbad, USA	D1306	28718-90-3
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	D2650	67-68-5
DL-TBOA	Tocris Bioscience, Avonmouth, UK	1223	205309-81-5
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	E-5134	6381-92-6
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt, DE	8187551000	200-580-7
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	E4378-25G	67-42-5
Fluorescent Streptavidin Kit	Vector Laboratories, Burlingame USA	VEC-SA-1200	---
GABA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	A2129	56-12-2
Glycerol (87 % [v/v])	Merck, Darmstadt, DE	1.04094	---
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3908.3	56-40-6
Guanosin-5'-triphosphat Natriumsalz Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	G8877	36051-31-7
HEPES PUFERAN®	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9105.4	7365-45-9
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, DE	1.04936	7447-40-7
Kalium-D-Glukonat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	G4500-100G	299-27-4
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE	1.09918	1310-58-3
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, DE	1.02382	10035-04-8
Kynurensäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	K3375	492-27-3
L-Aspartat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	A9256-100G	56-84-8
LE Agarose	Biozym Scientific, Hamburg, DE	840004	---
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	70166	---
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	63068-250G	7791-18-6
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	81381-250G	9002-89-5
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE	1.06688	26628-22-8
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3957.2	7647-14-5
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, DE	1.06346.1000	10049-21-5
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, DE	1.06329.1000	144-55-8
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, DE	1.09137.1000	1310-73-2
Neurobiotin™	Vector Laboratories, Burlingame USA	SP-1120	---
Nickel(II)-Chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	N6136	7791-20-0
NMDA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	M3262	6384-92-5
Normales Ziegenserum	Dako, Hamburg, DE	X00907	---
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	16005-1KG-R	30525-89-4
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	23225	---
Roti® coll 1	Carl Roth, Karlsruhe, DE	0258.1	7085-85-0
Salzsäure (1 N)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	K025.1	7647-01-0
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, DE	2326.2	151-21-3
SR-95531 (Gabazin)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	S106-10mg	104104-50-9
Sybr® Safe DNA Gel Stain	Life Technologies, Carlsbad, USA	s33102	---
Taq PCR Core Kit	QIAGEN N.V., Venlo, NL	201205	---
Tetraethylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	T2265	56-34-8
Tetrodotoxin Citrate	Biotrend Chemikalien, Köln, DE	BN0518	18660-81-6
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4855.2	77-86-1
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3051.3	9036-19-5
Tween® 20	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, GER	37470	9005-64-5
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE	M-7522	60-24-2

Tab. 6 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instruments, Martinsried, DE
Durchlauferhitzer HPT-2	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
Elektrophoresekammer Criterion™ Cell	Bio Rad Laboratories, München, DE
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Fokales Applikationssystem "Octaflow"	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
ICU	Till Photonics, Gräfelfing, DE
Imaging Kamera „Typ SensiCam“	PCO, Kelheim, DE
Kenwood Zerkleiner Acryl	Kenwood24 – Online-Shop, Görisried, DE
Kühlzentrifuge Z 233 MK-2	HERMLE Labortechnik, Wehingen, DE
Luigs & Neumann Display und Controller SM-1 und SM-5	Luigs und Neumann, Ratingen, DE
Magnetstäbchen-Sortiment	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Microplate Reader GENios	Tecan Group, Männedorf, CH
Mikroskop „Axioskop2 FS mot“	Carl Zeiss, Göttingen, DE
Mikroskop Biozero 800	Keyence, Osaka, JP
Mikrotom „Leica VT 1200S“	Leica Biosystems, Nussloch, DE
Mini-Sub™ DNA Cell	Bio Rad Laboratories, München, DE
Objektive „Achromplan 40x/0,8W & 10x/0,3W“	Carl Zeiss, Göttingen, DE
pH-Meter „HI 223 Calibration Check Microprocessor“	Hanna Instruments Deutschland, Kehl am Rhein, DE
Pipetten „Eppendorf Research“ (5-10, 10-100, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Polychrom V	Till Photonics, Gräfelfing, DE
Power Pac Universal/ Power Pac 200	Bio Rad Laboratories, München, DE
Reinstwasseranlage LaboStar	Siemens Water Technologies, San Diego, USA
Scanner Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Schego 850 Pumpe Optimal	Schemel & Goetz, Offenbach am Main, DE
SNT 12 V 100 W	Carl Zeiss, Göttingen, DE
Temperaturcontroller TC-10	npi electronic, Tamm, DE
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio Rad Laboratories, München, DE
Ultraschallbad "Sonorex"	Bandelin electronic, Karlsruhe, DE
Verstärker „EPC 10 Double“ und Elektrodenhalter	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, DE
Vortexer „Heidolph Reax top“	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Waage „KERN 440-35N“	KERN & Sohn, Ballingen-Frommern, DE
Wasserbad „LAUDA“	LAUDA, Lauda-Königshofen, DE

Tab. 7 Verwendete Software

Software	Hersteller
BZ image analysis application	Keyence, Osaka, JP
BZ observation application	Keyence, Osaka, JP
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, San Diego, USA
Image Studio Lite 3.1.4	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Magellan 6	Tecan Group, Männedorf, CH
Minianalysis 6.0.7	Synaptosoft, Fort Lee, USA
Odyssey® Infrared Imaging System-Application Software Version 1.2.15	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Patchmaster 2.73.5-2.90	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, DE
R 3.1.2	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, AU
Rstudio 1.0.136	RStudio, Boston, USA
Vision 4.5.56	Till Photonics, Gräfelfing, DE

9.2 Pullerprogramm und Umkehrpotentiale

Tab. 8 Programm 009 des DMZ Universalpullers.

P(B) H, P(B) t(F1), P(B) F1 und P(B) F2 wurden zur Einstellung des Pipettenwiderstandes genutzt.

Programmschritt	Parameter	H	F(TH)	s(TH)	t(H)	s(H)	t(F1)	F1	s(F2)	F2	AD
P(A)		500	016	021	052	030	000	---	---	---	121
P(B)		620	016	008	030	000	110	060	004	070	320

Tab. 9 Umkehrpotentiale der Ionen in Abhängigkeit von Pufferkombination und Temperatur

Puffer Kombination		Umkehrpotential (mV) 21°C				Umkehrpotential (mV) 34°C			
Extrazellular- lösung	Intrazellular- lösung	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ²⁺
EXS-Carbogen	INK-Phys	>>200	-102,03	-57,16	170,54	>>200	-106,54	-59,69	180,74
EXS-Carbogen	INK-High	>>200	-102,03	1,92	170,54	>>200	-106,54	2	180,74
EXS-Carbogen	INK-IPSC	84,36	>>200	2,78	>>200	87,99	>>200	2,91	>>200
EXS-HEPES	INK-Phys	>>200	-102,03	-61,67	170,54	>>200	-106,54	-64,4	180,74
EXS-HEPES	INK-High	>>200	-102,03	-2,59	170,54	>>200	-106,54	-2,71	180,74
EXS-HEPES	INK-IPSC	89,47	>>200	-1,73	>>200	93,42	>>200	-1,8	>>200

9.3 Übersicht der Ergebnisse

Tab. 10 Aktivitätsmustersverteilung

Genotyp	Alter	Tiere	Cl ⁻ _[i]	n	Messungen (Absolut + Anteil an Gesamtmessungen (%))			Tonisch vs. Rest	p-Wert Burst vs. Rest	Inaktiv vs. Rest
					Tonisch	Burst	Inaktiv			
NPC1 ^{+/+}	45-53	8	Phys.	29	1 (3,45%)	24 (82,76%)	4 (13,79%)	1	0,890	0,923
NPC1 ^{-/-}	45-55	7	Phys.	30	1 (3,33%)	24 (80%)	5 (16,67%)			
NPC1 ^{+/+}	45-56	19	Hoch	54	14 (25,93%)	27 (50%)	13 (24,07%)	0,001	0,095	0,078
NPC1 ^{-/-}	45-55	15	Hoch	43	25 (58,14%)	14 (32,56%)	4 (9,30%)			

Tab. 11 Frequenzen und Koeffizienten der mittleren Aktionspotentialabständen (KMAA) tonisch aktiver Purkinjezellen

Genotyp	Alter	Tiere	Cl ⁻ _[i]	n	Frequenz (Hz)				KMAA (%)			
					Mittelwert	StabW	SfM	p-Wert	Mittelwert	StabW	SfM	p-Wert
NPC1 ^{+/+}	47-56	12	Hoch	14	142	32,24	8,62	0,022	10,29	3,41	0,91	0,087
NPC1 ^{-/-}	45-55	11	Hoch	25	110,4	43,05	8,61		8,50	2,84	0,57	

Tab. 12 Aktivitätsmuster veränderter Effekt von TBOA

Genotyp	Alter	Tiere	Cl ⁻ _[i]	n	TBOA-Effekt (Absolut + Anteil an Gesamtmessungen (%))		p-Wert
					Absolut	Anteil an Gesamtmessungen (%)	
NPC1 ^{+/+}	45-52	5	Phys.	10	9	90%	0,022
NPC1 ^{+/+}	45-56	7	Hoch	16	7	43,75%	
NPC1 ^{-/-}	45-55	3	Phys.	12	8	66,67%	0,101
NPC1 ^{-/-}	45-55	5	Hoch	14	13	92,86%	

Tab. 13 Gleichgewichtspotentiale

Genotyp	Alter	Tiere	n	E _{GG} Kontrollphase (mV)				E _{GG} TBOA Applikation (mV)			
				Mittelwert	StabW	SfM	p-Wert	Mittelwert	StabW	SfM	p-Wert
NPC1 ^{+/+}	48-53	4	18	-78,92	6,36	1,50	0,499	-78,46	7,53	1,77	0,234
NPC1 ^{-/-}	46-54	4	16	-80,63	8,18	2,04		-81,66	7,81	1,95	

Tab. 14 Einfluss von L-Aspartat auf das Gleichgewichtspotential

Genotyp	Alter	Tiere	n	ΔE _{GG} Kontrollephase zu Aspartat Applikation (mV)				p-Wert (E _{Rest} Kon vs Asp)	n	ΔE _{GG} TBOA Applikation zu TBOA Aspartat Applikation (mV)			
				Mittelwert	StabW	SfM	Mittelwert			StabW	SfM	p-Wert (E _{Rest} Kon vs Asp)	
NPC1 ^{+/+}	48-53	4	17	0,029	0,558	0,135	0,831	18	-0,044	0,875	0,206	0,832	
NPC1 ^{-/-}	46-54	4	18	-0,678	1,083	0,255	0,017	15	-0,340	0,503	0,130	0,020	

Tab. 15 IPSC Frequenzen

Genotyp	Alter	Tiere	n	Frequenz (Hz)				p-Wert
				Mittelwert	StabW	SfM		
NPC1 ^{+/+}	19-25	7	17	3,38	2,66	0,65	0,061	
NPC1 ^{-/-}	22-25	11	25	5,84	4,77	0,95		

Tab. 16 IPSC Frequenzerhöhung durch NMDA

Genotyp	Alter	Tiere	n	Frequenzsteigerung durch NMDA bei x Zellen (Absolut + Anteil an Gesamtmessungen (%))		p-Wert
				Absolut	Anteil an Gesamtmessungen (%)	
NPC1 ^{+/+}	19-25	6	15	11	73,33%	0,001
NPC1 ^{-/-}	21-25	10	27	6	22,22%	

Tab. 17 Ausmaß der IPSC Frequenzerhöhung durch NMDA

Genotyp	Alter	Tiere	n	Frequenzsteigerung durch NMDA um Faktor x			p-Wert
				Mittelwert	StabW	SfM	
NPC1 ^{+/+}	19-24	5	8	4,19	2,35	0,83	0,120
NPC1 ^{-/-}	22-25	4	4	2,13	0,43	0,21	

Tab. 18 Western Blot

Zielprotein	Genotyp	Alter	Tiere	n	Blots	Signalintensität relativ zu β -Aktin (% NPC1 ^{+/+})			p-Wert
						Mittelwert	StabW	SfM	
Calbindin	NPC1 ^{+/+}	55	8	25	9	100,0	46,5	9,3	< 0,001
Calbindin	NPC1 ^{-/-}	55	8	23	9	26,3	11,6	2,4	
Calbindin	NPC1 ^{+/+}	22	3	3	1	100,0	11,8	6,8	0,377
Calbindin	NPC1 ^{-/-}	22	3	3	1	88,9	15,3	8,8	
EAAT1	NPC1 ^{+/+}	55	5	10	5	100,0	3,5	1,1	< 0,001
EAAT1	NPC1 ^{-/-}	55	5	8	5	64,3	12,1	4,3	
EAAT2	NPC1 ^{+/+}	55	8	16	5	100,0	47,3	11,8	0,001
EAAT2	NPC1 ^{-/-}	55	8	13	5	41,8	26,3	7,3	
EAAT4	NPC1 ^{+/+}	55	8	25	9	100,0	20,4	4,1	0,008
EAAT4	NPC1 ^{-/-}	55	8	23	9	82,4	23,7	4,9	
β III Spektrin	NPC1 ^{+/+}	55	8	25	9	100,0	22,1	4,4	< 0,001
β III Spektrin	NPC1 ^{-/-}	55	8	23	9	44,6	21,2	4,4	
GluA2	NPC1 ^{+/+}	22	3	6	2	100,0	21,6	8,8	0,591
GluA2	NPC1 ^{-/-}	22	3	6	2	106,8	20,5	8,4	
GluA2	NPC1 ^{+/+}	55	3	6	2	100,0	6,3	2,6	0,025
GluA2	NPC1 ^{-/-}	55	3	6	2	84,7	12,8	5,2	
P-Ser880-GluA2	NPC1 ^{+/+}	22	3	6	2	100,0	4,5	1,8	0,001
P-Ser880-GluA2	NPC1 ^{-/-}	22	3	6	2	74,7	13,3	5,4	
P-Ser880-GluA2	NPC1 ^{+/+}	55	3	6	2	100,0	3,3	1,4	< 0,001
P-Ser880-GluA2	NPC1 ^{-/-}	55	3	6	2	56,7	18,5	7,5	
P-Ser-PKC-Substrat	NPC1 ^{+/+}	22	3	6	2	100,0	4,9	2,0	0,157
P-Ser-PKC-Substrat	NPC1 ^{-/-}	22	3	6	2	87,3	19,8	8,1	
P-Ser-PKC-Substrat	NPC1 ^{+/+}	55	3	6	2	100,0	20,3	8,3	0,043
P-Ser-PKC-Substrat	NPC1 ^{-/-}	55	3	6	2	132,1	27,3	11,1	

Tab. 19 Anteil von P-Ser880-GluA2 an totaler GluA2 Menge

Zielprotein	Genotyp	Alter	Ratio (%)
P-Ser880-GluA2/GluA2	NPC1 ^{-/-}	22	70,0
P-Ser880-GluA2/GluA2	NPC1 ^{-/-}	55	67,0

10 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen Dank an all jene aussprechen, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Dabei möchte ich mich insbesondere bei Herrn Professor Rolfs, der mir die Chance gab, diese Arbeit im Albrecht-Kossel-Institut anzufertigen, und Herrn Dr. Frech, welcher mich während der Arbeit betreute, bedanken.

Auch gilt mein Dank all den anderen Mitarbeitern des Albrecht-Kossel-Instituts, die stets ein offenes Ohr für Fragen und Diskussionen hatten.

Und natürlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, welche mich besonders als Gegenpol zu meiner Doktorarbeitszeit unterstützt haben und mir dadurch geholfen haben mein inneres Gleichgewicht zu wahren.