

**Der Einfluss des antikonvulsiven Wirkstoffes  
Topiramamat auf die cholinerge Signaltransmission  
der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y**

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
der Doktorin der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

**Marie-Luise Kümmel**

Saarbrücken

2021

Tag des Kolloquiums:	11. Juni 2021
Dekan:	Prof. Dr. Jörn Erik Walter
Berichterstatter:	Prof. Dr. Uli Müller Jun.- Prof. Dr. Daniela Yildiz
Vorsitz:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Sascha Tierling

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,  
das gelöst werden will.

- Galileo Galilei

Für meine Familie und alle, die immer an mich geglaubt haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	7
1.1 Erregung und Inhibition als Grundlage neuronaler Prozesse .....	7
1.2 Das neuronale Ungleichgewicht als Ursache neurologischer Erkrankungen .....	8
1.3 Die medikamentöse Wiederherstellung des neuronalen Gleichgewichtes .....	12
1.3.1 Topiramate, ein bimodaler Wirkstoff zur Wiederherstellung des neuronalen Gleichgewichtes .....	14
1.3.2 Die Analyse der TPM-Wirkung auf Einzelzellebene als neue Strategie zur Aufklärung der Wirkungseigenschaften .....	17
<b>2 Zielsetzung</b> .....	21
<b>3 Material und Methoden</b> .....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Chemikalien.....	22
3.1.2 Puffer und Verbrauchslösungen .....	24
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.4 Antikörper .....	26
3.1.5 Primer .....	26
3.1.6 Geräte .....	27
3.2 Methoden .....	28
3.2.1 Zellkultur der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y.....	28
3.2.2 Calcium-Imaging Experimente.....	30
3.2.3 qRT-PCR.....	38
3.2.4 ELISA-Assay.....	39
3.2.5 Puromycin-Assay .....	40
3.2.6 Histologische Färbungen .....	41
<b>4 Ergebnisse</b> .....	45
4.1 Die Verwendung der SHSY-5Y Zelllinie zur Analyse Acetylcholin-induzierter Calciumsignale .....	45
4.1.1 Die mRNA-Expression nikotinischer Acetylcholinrezeptoren stimmt mit den Daten aus der Literatur überein.....	45
4.1.2 TPM beeinflusst ACh-induzierte Calciumsignale in differenzierten und undifferenzierten SHSY-5Y Zellen.....	46
4.2 Etablierung eines Messsystems zur Analyse von ACh-induzierten Calciumsignalen unter Berücksichtigung aktivitätsabhängiger Adaptionen .....	49
4.2.1 Auswertung der Ca <sup>2+</sup> -Signale bei multipler Stimulation .....	50
4.3 TPM besitzt eine unterschiedliche Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA.....	56

4.3.1	TPM verstärkt und beschleunigt ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit von GABA .....	56
4.3.2	TPM hemmt ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA .....	63
4.4	Identifizierung intrazellulärer Zielstrukturen mit Bezug zur hemmenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale.....	68
4.4.1	Veränderungen im Vorliegen posttranslatonaler Proteinmodifikationen wirken sich auf die Wirkung von TPM aus .....	68
4.4.2	TPM besitzt eine hemmende Wirkung in Anwesenheit einer Sirt-1 Inhibition.....	75
4.4.3	Die Wirkung von TPM ist translationsabhängig .....	78
4.5	TPM beeinflusst die Aktivität von Sirt-1 in SHSY-5Y Zellen .....	85
4.5.1	Die Vorbehandlung der Zellen mit TPM induziert möglicherweise eine Zunahme der Sirt-1 Aktivität .....	85
4.5.2	Inauhzin beeinflusst die TPM-induzierte Zunahme von pSirt-1 im Zellkern nicht .....	88
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
5.1	TPM beeinflusst ACh-induzierte Calciumsignale .....	91
5.1.1	TPM beeinflusst möglicherweise die Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen.....	92
5.2	Die Wirkung von TPM unterscheidet sich in An- und Abwesenheit von GABA.....	94
5.2.1	Die Wirkung von GABA an den SHSY-5Y wird möglicherweise über GABA <sub>B</sub> Rezeptoren vermittelt .....	94
5.2.2	Eine GABA-induzierte Modulation der Translation als Grundlage der hemmenden TPM-Wirkung .	95
5.3	Sirt-1 spielt sowohl bei der hemmenden, als auch bei der stimulierenden TPM-Wirkung zentrale Rolle..	96
5.3.1	Sirt-1 könnte eine GABA-induzierte Beeinflussung der Translation vermitteln.....	97
5.3.2	Die stimulierende TPM Wirkung steht mit einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern in Verbindung.....	100
5.3.3	Sirt-1 wird möglicherweise komplex reguliert .....	101
5.4	Ausblick.....	102
5.4.1	Die TPM-Wirkung auf das cholinerge System ist wichtig für die zukünftige Forschung .....	102
5.4.2	GABA beeinflusst die TPM-Wirkung: Neuinterpretation der Wirkung von TPM auf das glutamaterge System.....	105
5.4.3	Die gewonnenen Erkenntnisse helfen auch dem Verständnis der neuronalen Regulation .....	107
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>110</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	110
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	112
8.3	Literaturverzeichnis .....	115
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>129</b>
9.1	Ergänzende Calcium-Imaging Experimente .....	129

9.2 Calcium-Imaging Statistik .....	130
9.3 ImageJ-Makros .....	147
<b>10 Danksagung</b> .....	<b>148</b>
<b>11 Lebenslauf und akademischer Werdegang</b> .....	<b>150</b>

# 1 Einleitung

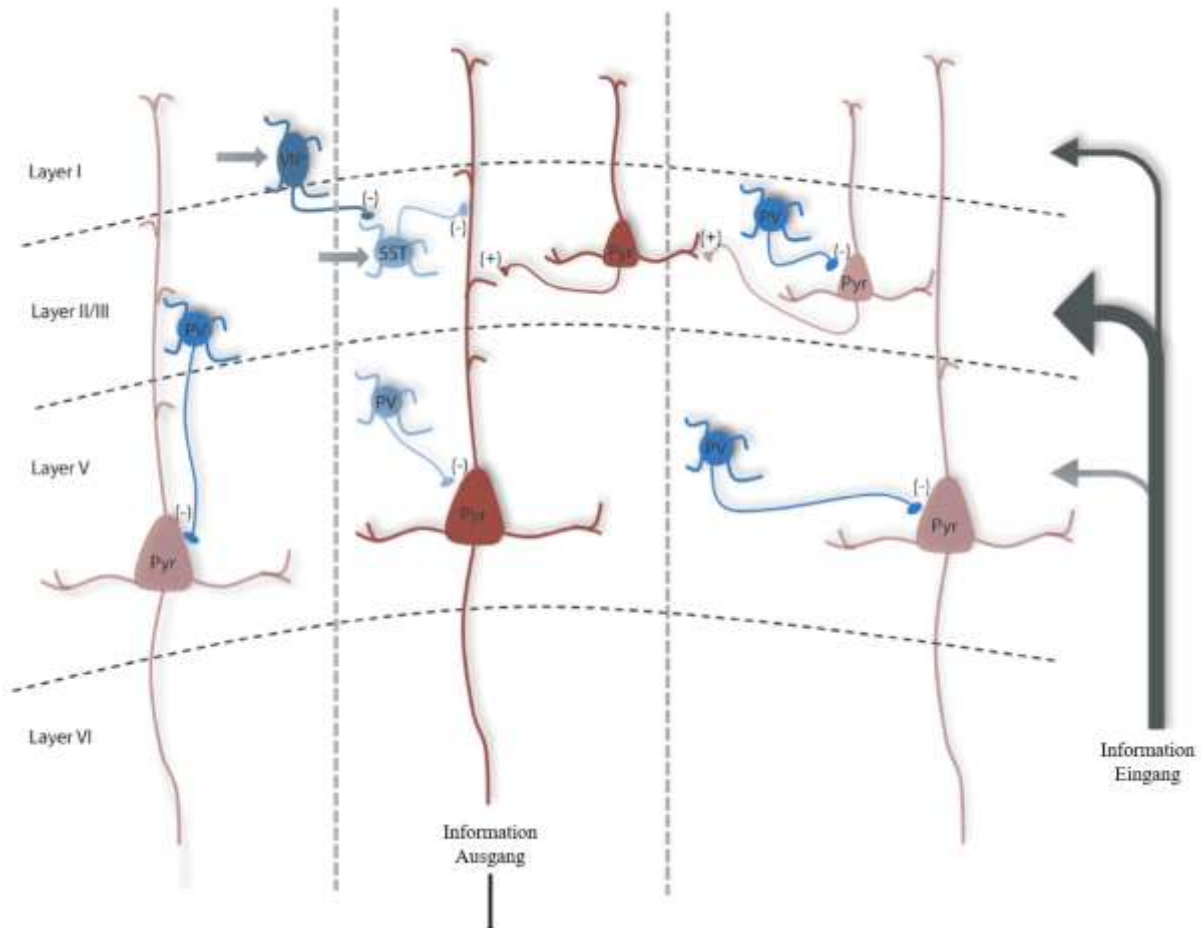
## 1.1 Erregung und Inhibition als Grundlage neuronaler Prozesse

Das menschliche Gehirn ist aus einem komplexen Netzwerk aus Neuronen aufgebaut, deren Kommunikation die molekulare Grundlage aller neuronalen Prozesse, wie beispielsweise der Sinneswahrnehmung, dem Lernen und der Gedächtnisbildung bildet (Lovinger 2008, Mayford et al. 2012). Das Grundprinzip dieser neuronalen Kommunikation besteht dabei darin, dass Informationen als erregende Signale zwischen Neuronen weitergegeben werden, wobei die Art und Ausprägung der Erregung durch die Integration hemmender Signale gesteuert wird (Lovinger 2008). Zu diesem Zweck stehen erregende und hemmende Neurone im neuronalen Netzwerk auf unterschiedliche Art und Weise miteinander in Kontakt.

Der Grundaufbau neuronaler Netzwerke aus erregenden und hemmenden Neuronen kann exemplarisch am Aufbau des präfrontalen Cortex (PFC) dargestellt werden (Abbildung 1). Der präfrontale Cortex, dessen Funktion unter anderem in der Steuerung des Arbeitsgedächtnisses, der kognitiven Flexibilität und der Entscheidungsfindung besteht, ist aus erregenden Pyramidenneuronen (rot) und hemmenden Interneuronen (blau) aufgebaut, die sowohl untereinander, als auch miteinander in Kontakt stehen können. Erregende Signale aus verschiedenen Hirnregionen, wie dem Thalamus, dem Hippocampus oder der Amygdala, erreichen den PFC über afferente neuronale Verbindungen, werden innerhalb des PFC auf komplexe Art und Weise miteinander verrechnet und anschließend als Ausgangssignal über efferente Neurone wieder an andere Hirnbereiche weitergegeben (Ferguson und Gao 2018).

Diese enge und komplexe Kopplung von Erregung und Inhibition bildet die Grundlage der beiden wichtigsten Eigenschaften neuronaler Netzwerke: Plastizität und Stabilität (Schulz 2006). Die neuronale Plastizität beschreibt dabei die Eigenschaft des Netzwerkes, die Verbindung zwischen Neuronen aktivitätsabhängig zu stärken oder zu schwächen und so eine gerichtete Informationsübertragung zwischen Neuronen zu ermöglichen, die die Grundlage neuronaler Prozesse wie beispielsweise Lernen und Gedächtnisbildung darstellt. Um zu verhindern, dass die stattfindenden aktivitätsabhängigen Umbauprozesse neuronaler Verbindungen in Rahmen der neuronalen Plastizität ein Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung auf Ebene des Gesamtnetzwerkes hervorrufen, sind all diese Prozesse streng reguliert. Dies geschieht durch Mechanismen der neuronalen Homöostase (D'Angelo 2010, Pozo und Goda, 2010, Davis 2013). Homöostatische Prozesse wirken den aktivitätsabhängigen, plastischen Veränderungen entgegen und verhindern so eine unphysiologische Über- oder Untererregung des neuronalen Netzwerkes. Das Zusammenspiel von Plastizität und Homöostase

ermöglicht es, dass zu jedem Zeitpunkt ein funktionelles Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung auf Ebene des Gesamtnetzwerkes aufrechterhalten wird.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines neuronalen Netzwerkes anhand des Aufbaus des präfrontalen Cortex (PFC)**

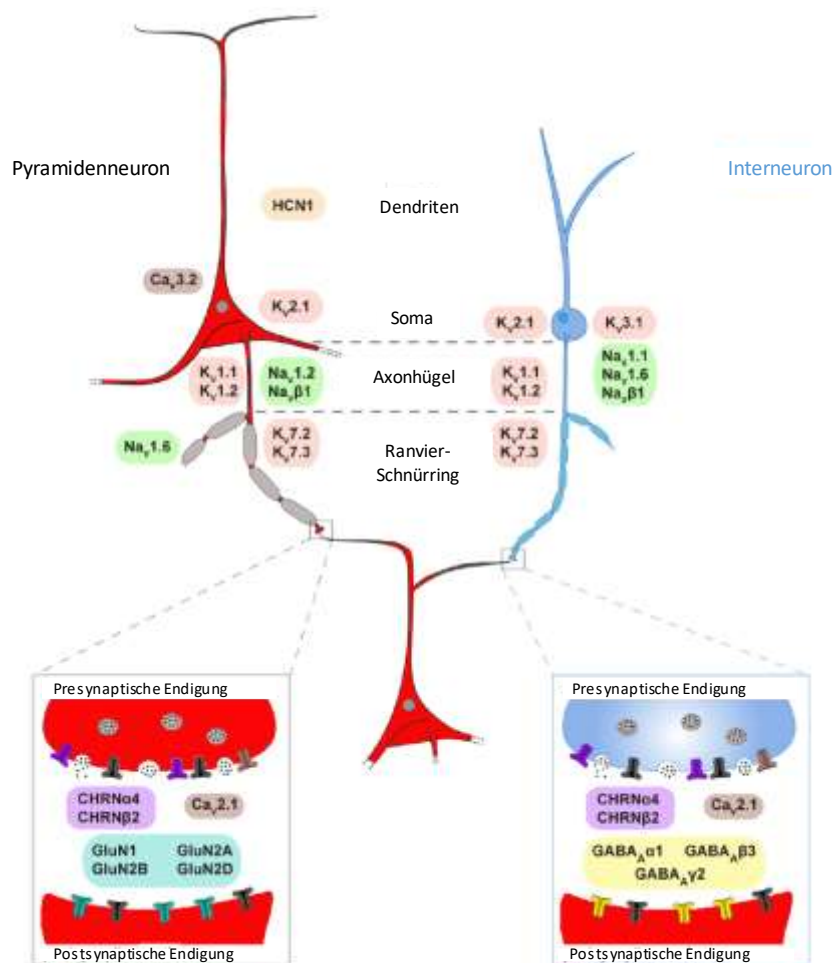
Im präfrontalen Cortex sind die erregenden Pyramidenneurone (rot, „Pyr“) auf komplexe Weise mit verschiedenen Subtypen hemmender Interneurone (blau; Paralvumin-positive Interneurone „PV“, Somatostatin-positive Interneurone „SST“, Vasoaktives Intestinalpeptid-positive Interneurone „VIP“) verknüpft. Auf diese Weise erfolgt die Verrechnung eingehender Signale zu einem gerichteten Ausgangssignal. Abbildung modifiziert nach: Ferguson und Gao, 2018.

## 1.2 Das neuronale Ungleichgewicht als Ursache neurologischer Erkrankungen

Wie wichtig die Aufrechterhaltung eines funktionalen Gleichgewichtes zwischen Erregung und Hemmung auf Ebene des Gesamtnetzwerkes ist, zeigt sich dadurch, dass Störungen dieses Gleichgewichtes schwerwiegende neurologische Erkrankungen zur Folge haben können. Dabei führt die Verschiebung des Gleichgewichtes sowohl in Richtung einer Über-, als auch in Richtung einer Untererregung zur Ausbildung neurologischer Krankheitsbilder.



Ein typisches Krankheitsbild, welches in Verbindung mit der Verschiebung des neuronalen Gleichgewichtes hin zu einer Übererregung steht, stellt Epilepsie dar, eine Erkrankung, die sich vor allem über das Auftreten von Krampfanfällen, den sogenannten epileptischen Anfällen, definiert (Sirven 2015). Bis heute ist eine Vielzahl von Ursachen bekannt, die eine solche Übererregung neuronaler Netzwerke hervorrufen und der Entstehung von Epilepsie zugrunde liegen können. Neben Hirnläsionen, Hirntumoren und Infektionserkrankungen stellen in vielen Fällen auch genetische Mutationen die Ursache für die Entstehung von Epilepsie dar (van Loo und Becker 2020). Bis heute sind mehr als 977 Genmutationen bekannt, die im Zusammenhang mit Epilepsie stehen. Rund 25% der Mutationen betreffen Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanäle und können sowohl einen Funktionsverlust (*loss-of-function mutation*) oder einen Funktionszugewinn (*gain-of-function mutation*) des betroffenen Rezeptors oder Kanals hervorrufen. Die betroffenen Rezeptoren und Kanäle können zudem sowohl an den Synapsen, als auch auf erregenden Pyramidenzellen und/oder auf hemmenden Interneuronen lokalisiert sein (Wang et al. 2017, Oyrer et al. 2018). Abbildung 2 stellt einige Ionenkanäle und Transmitterrezeptoren dar, deren Mutationen mit einer Entstehung von Epilepsie in Verbindung gebracht werden.



**Abbildung 2: Übersicht verschiedener Rezeptor- und Ionenkanaluntereinheiten, deren Mutationen mit der Entstehung von Epilepsie in Verbindung gebracht werden**

Viele Mutationen, die mit Epilepsien in Verbindung gebracht werden, betreffen Untereinheiten spannungsabhängiger Ionenkanäle, die sowohl auf erregenden Pyramidenneuronen, als auch auf hemmenden Interneuronen lokalisiert sein können. Auch Mutationen von Transmitterrezeptoren in den Synapsen zwischen erregenden und hemmenden Neuronen können Epilepsien verursachen.

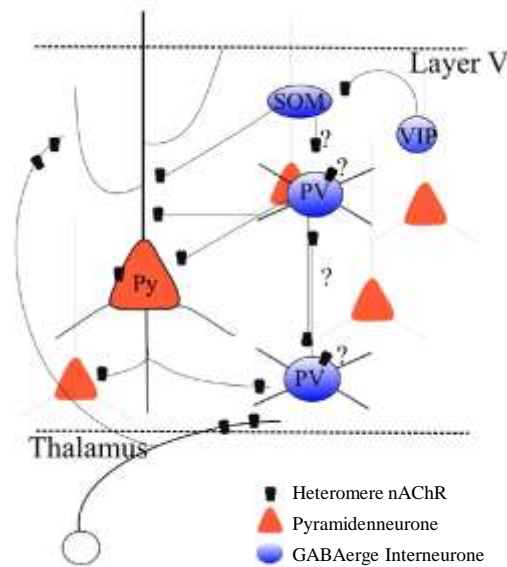
„HCN“: *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*; „Ca<sub>v</sub>“: spannungsgesteuerter Calciumkanal, „K<sub>v</sub>“: spannungsgesteuerter Kaliumkanal ; „Na<sub>v</sub>“: spannungsgesteuerter Natriumkanal ; „CHRN“: nikotinischer Acetylcholinrezeptor, „GluN“ : glutamaterger NDMA Rezeptor, „GABA“ : GABA-Rezeptor.

Abbildung modifiziert nach Oyler et al. 2018

Die unterschiedliche zelluläre Lokalisation und die verschiedenen funktionellen Konsequenzen der mutierten Rezeptoren und Kanäle haben beispielsweise auch zur Folge, dass die Ursache der Übererregung auf Ebene des Gesamtnetzwerkes bei einigen Epilepsieformen gar nicht primär auf einer vermehrten Erregung, sondern vielmehr auf einer verringerten Hemmung beruht. Dies ist zum Beispiel beim Dravet-Syndrom der Fall. Das Dravet-Syndrom, bei dem es sich um eine schwere Form frühkindlicher myklonischer Epilepsie handeln, wird in 70-80% der Fälle durch eine *loss-of-function* Mutation des spannungsabhängigen Natriumkanals Na<sub>v</sub>1.1 hervorgerufen (Le et al. 2017). Da dieser Natriumkanal vor allem auf inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird und deren Erregung

vermittelt, führt der Funktionsverlust dieses Natriumkanals zur Beeinträchtigung der hemmenden neuronalen Signaltransmission (Tai et al. 2014). Die dadurch auftretende „Disinhibition“ des neuronalen Netzwerkes kann zur Ausbildung epileptischer Anfälle führen (Oyrer et al. 2018).

Allerdings kann eine Übererregung nicht nur durch Fehlfunktionen von Ionenkanälen oder durch Beeinträchtigungen der erregenden, glutamatergen oder hemmenden GABAergen Signaltransmission hervorgerufen werden. Vielmehr kann die Ursache für das auftretende Ungleichgewicht bei manchen Epilepsieformen auch auf einer Fehlfunktion des modulatorisch-wirkenden cholinergen Systems beruhen. Acetylcholin stellt neben Glutamat den zweithäufigsten erregenden Neurotransmitter im menschlichen Gehirn dar, vermittelt im Gegensatz zu Glutamat jedoch nicht primär die erregende Signalweiterleitung, sondern agiert vielmehr als neuroregulatorischer Transmitter (Picciotto et al. 2012). So liegen beispielsweise im Cortex ionotrope nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sowohl prä- als auch postsynaptisch auf erregenden Pyramidenneuronen und hemmenden Interneuronen vor und regulieren auf diese Weise sowohl die Freisetzung von Glutamat und GABA, als auch die intrinsische Erregbarkeit der Neurone (Becchetti et al. 2015, Abbildung 3). Zudem sind cholinerge Rezeptoren auch auf den afferenten Neuronen subcortikaler Bereiche, wie dem Thalamus, exprimiert, welche sowohl kortikale Pyramidenzellen, als auch GABAerge Interneurone innervieren (Becchetti et al. 2015, Abbildung 3). Auf diese Weise reguliert das cholinerge System die erregende und hemmende Signaltransmission innerhalb des Cortex und moduliert darüber hinaus auch die eingehende Erregung aus anderen Hirnbereichen (Becchetti et al. 2015, Villa et al. 2019).



**Abbildung 3: Lokalisation nikotinischer Acetylcholinrezeptoren auf Pyramidenzellen und Interneuronen im Cortex**

Ionotrope nikotinische Acetylcholinrezeptoren konnten im Cortex sowohl auf erregenden Pyramidenzellen (rot, „Py“) als auch auf hemmenden GABAergen Interneuronen nachgewiesen werden (blau, Paralvumin-positive Interneurone „PV“, Somatostatin-positive Interneurone „SOM“, Vasoaktives-Intestinalpeptid-positive Interneurone „VIP“). Abbildung modifiziert nach Becchetti et al. 2015.

Aufgrund dieser zentralen regulatorischen Funktion können Fehlfunktionen des cholinergen Systems somit ebenfalls eine Ursache für die Entstehung von Epilepsie darstellen. Eine Epilepsieform, welche auf einer Beeinträchtigung des cholinergen Systems beruht, stellt die autosomal dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (adnFLE) dar. Hierbei liegt eine *gain-of-function* Mutation der  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  oder  $\beta 2$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors vor, was zu einer erhöhten Sensitivität des Rezeptors gegenüber Acetylcholin oder zur Verschiebung des Verhältnisses zwischen niedrig-sensitiven zu hoch-sensitiven Rezeptoren führt (Oyler et al. 2018). Dabei konnte unter anderem auch gezeigt werden, dass Mutationen der  $\alpha 4$ -Untereinheit nikotinischer AChR nur hemmende, nicht aber erregende, postsynaptische Potentiale bis zu 20-fach verstärken. Daher stellt die Fehlregulation hemmender Interneurone auch bei dieser Epilepsieform einen möglichen Mechanismus zur Ausbildung epileptischer Anfälle dar (Klaassen et al. 2006).

### 1.3 Die medikamentöse Wiederherstellung des neuronalen Gleichgewichtes

Eine Behandlung der verschiedenen Epilepsieformen erfolgt grundsätzlich mit dem Ziel, das empfindliche Gleichgewicht zwischen Erregung und Inhibition wiederherzustellen und erfolgt heutzutage überwiegend medikamentös. Zu diesem Zweck gibt es eine Reihe von antiepileptischen Wirkstoffen (engl. *anti-epileptic-drug*, AED) auf dem Markt, welche sich grundsätzlich in zwei große Wirkstoffklassen einteilen lassen: Wirkstoffe, welche die Erregung hemmen (z.B. Phenytoin, Zonisamid, Perampanel etc.) und solche, welche die Hemmung potenzieren (z.B. Benzodiazepine)

(White et al. 2007, Deshmukh et al. 2011). Phenytoin beispielsweise reduziert die Erregung, indem es Natriumkanäle hemmt. Benzodiazepine potenzieren die Hemmung, indem sie als allosterische Modulatoren an ionotrope GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren binden, wodurch beispielsweise die Bindeaffinität von GABA an den Rezeptor verstärkt wird (White et al. 2007, Deshmukh et al. 2011).

Trotz der großen Anzahl an verfügbaren Wirkstoffen ist eine erfolgreiche Therapie jedoch bis heute nicht immer möglich und rund 30% aller Epilepsiepatienten leiden sogar unter sogenannten „*drug-resistant*“-Epilepsien, also Epilepsieformen, die mit den verfügbaren Wirkstoffen nicht behandelbar sind (Wahab 2010). Ein Grund dafür liegt natürlich auch in der großen Vielfalt möglicher Ursachen, die Epilepsien zugrunde liegen können.

So können beispielsweise zur Behandlung des Dravet-Syndroms keine Natriumkanal-Blocker wie Lamotrigin, Carbamazepin oder Phenytoin verwendet werden, da die Hemmung der Natriumkanäle zusätzlich zur *loss-of-function* Mutation des Na<sub>v</sub>1.1-Kanals zu einer Verschlimmerung der Erkrankung und Verstärkung der Symptome führen würde (Oyler et al. 2018). Ähnliche Probleme können auch bei der Behandlung neonataler Epilepsien mit Benzodiazepinen auftreten. Der Grund dafür liegt darin, dass der Neurotransmitter GABA in frühen Entwicklungsstadien keine inhibitorische, sondern vielmehr eine exzitatorische Funktion besitzt. AED's wie Benzodiazepine wirken antikonvulsiv, indem sie die Funktion von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren potenzieren und so die Inhibition verstärken. Dies ist allerdings nur dann der Fall, wenn GABA eine inhibitorische Funktion besitzt. Das ist jedoch in frühen Entwicklungsstadien nicht gegeben, sodass eine Behandlung neonataler Epilepsien mit Benzodiazepinen eine Verschlimmerung der Erkrankung hervorrufen kann (Shao et al. 2019). Ein weiteres Problem bei der medikamentösen Behandlung von Epilepsie stellt die Tatsache dar, dass für manche Epilepsieformen noch gar keine adäquaten Wirkstoffe vorliegen. So sind bis heute beispielsweise noch keine Wirkstoffe bekannt, die spezifisch die Signaltransmission an Acetylcholinrezeptoren beeinflussen und so gezielt zur Behandlung von adnFLE eingesetzt werden können (Oyler et al. 2018).

Erschwert wird die medikamentöse Behandlung von Epilepsien zusätzlich durch auftretende Nebenwirkungen und durch die Entwicklung von Toleranzen gegenüber den verwendeten Wirkstoffen (Löscher und Schmidt 2006, Wahab 2010). So ist beispielsweise bekannt, dass die Einnahme eines Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum zu einem Verlust seiner molekularen Zielstrukturen führen kann, ein Phänomen, was als pharmakodynamische Toleranz bezeichnet wird (Löscher und Schmidt 2006). Ein Beispiel dafür stellt die Reduktion der Benzodiazepin-Bindestellen an GABA<sub>A</sub> Rezeptoren nach längerer Einnahme dieser Wirkstoffe dar (Löscher und Schmidt 2006). Als weitere mögliche Ursache der Toleranzentwicklung kommen auch homöostatische Prozesse in Frage. Es ist bekannt, dass die chronische Hemmung der neuronalen Aktivität – beispielsweise durch den Einsatz antiepileptischer

Wirkstoffe - eine homöostatische, kompensatorische Zunahme der Erregung hervorrufen kann und so den Erfolg der medikamentösen Behandlung aufheben kann (André et al. 2018).

Einen guten Ansatz um möglicherweise viele der genannten Probleme bei der Behandlung von Erkrankungen wie Epilepsien, die auf einem unbalancierten neuronalen Netzwerk beruhen, zu umgehen, stellt die Verwendung „bimodaler“ antiepileptischer Wirkstoffe dar. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen unimodalen Wirkstoffen, welche „entweder“ die Erregung runterregulieren (z.B. Phenytoin, Lamotrigin, Abbildung 4), „oder“ die Hemmung verstärken (z.B. Benzodiazepine, Tiagabin, Abbildung 4) besitzen bimodale Wirkstoffe die einzigartige Eigenschaft, auf beide Bereiche der Signaltransmission simultan Einfluss zu nehmen (Shao et al. 2019). Die parallele Beeinflussung von Erregung und Hemmung ermöglicht es dadurch, die bei Epilepsien auftretende Übererregung sehr zuverlässig zu behandeln. Diese dritte AED-Wirkstoffklasse umfasst bis heute nur drei Wirkstoffe: Felbamate, Valproat und Topiramat (Abbildung 4).

Drug	Sodium Channels	Calcium Channels/Currents	GABA Receptors	GABA Synapse	Glutamate Receptors	Other
<b>Older AEDs</b>						
Benzodiazepines			+++			Abuse potential may limit use
Phenytoin	+++					
Valproate	+++	+ (Modulates T-type Currents)		+		
<b>Newer AEDs</b>						
Lamotrigine	+++	+				
Tiagabine				+++		
Felbamate	++	++		++	++	Idiosyncratic Toxicity limits use
Topiramate	++	++	++	+	++	+weak carbonic anhydrase inhibition

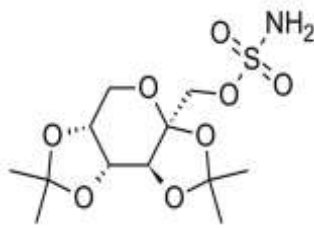
+++ Primary target; ++ Probable target; + Possible target.

**Abbildung 4: Übersicht verschiedener antiepileptische Wirkstoffe und ihrer Zielstrukturen und Wirkungseigenschaften**

Abbildung modifiziert nach Louis 2009

### 1.3.1 Topiramat, ein bimodaler Wirkstoff zur Wiederherstellung des neuronalen Gleichgewichtes

Vergleicht man die molekularen Wirkungseigenschaften der oben genannten antiepileptischen Wirkstoffe mit bimodaler Wirkung, so ist zu erkennen, dass Topiramat (Handelsname *Topamax*, TPM, Abbildung 5) den Wirkstoff mit dem umfassendsten molekularen Wirkungsspektrum darstellt.



**Abbildung 5: Chemische Strukturformel von Topiramate (TPM)**

Bildquelle: Owona et al. 2019

Topiramate kann zur Behandlung einer Vielzahl verschiedener, auch komplexer, Epilepsieformen angewendet werden und zählt deshalb zur Klasse der sogenannten Breitspektrum-Antiepileptika. So kann durch den Einsatz von TPM zur Behandlung von adnFLE beispielsweise bei 25% der Patienten eine Anfallsfreiheit und bei 62,5% der Patienten eine Reduktion der Anfallshäufigkeit um mehr als 50% erreicht werden (Ferini-Strambi et al. 2012). Bei der Behandlung von Kindern mit Dravet-Syndrom konnte eine Anfallsfreiheit in 17% der Fälle und eine Reduktion der Anfallshäufigkeit um mehr als 50% in 78% der Fälle beobachtet werden (Kröll-Seger et al. 2006). Darüber hinaus liegen bereits erste Hinweise darauf vor, dass TPM im „*off-label-use*“ auch zur Therapie anderer Erkrankungen, wie beispielsweise Migräne, Ischämie, Alkohol- und Medikamentenmissbrauch, Binge-Eating-Disease und posttraumatischen Belastungsstörungen eingesetzt werden kann (Shank und Maryanoff 2008).

Topiramate wurde 1993 erstmals als Wirkstoff gegen Diabetes synthetisiert, wenig später wurde in Screening-Experimenten gezeigt, dass auch eine antiepileptische Wirkung vorliegt. Über standardisierte *in vivo*-Experimente zur Ermittlung einer antikonvulsiven Wirkung konnte dabei gezeigt werden, dass TPM sowohl elektrisch-induzierte, als auch chemisch-induzierte Krampfanfälle reduzieren kann (Shank et al. 1994, Wauquier und Zhou 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass TPM auch das Auftreten von Krampfanfällen in epileptischen Rattenlinien (*spontaneously epileptic rat*, SER) hemmt (Nakamura et al. 1994).

Die Untersuchung der molekularen Grundlagen dieser antikonvulsiven Wirkung von TPM erfolgte in den darauffolgenden Jahren überwiegend mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen oder Calcium-Imaging-Experimenten an Hirnschnitten oder an *in-vitro* kultivierten Primärneuronen aus Nagern, wie Maus und Ratte. Beide Methoden zählen zu den Standardmethoden, die zur Aufklärung der Wirkungseigenschaften neuromodulativer Substanzen angewendet werden. Zur Messung von Neuronen in präparierten Hirnschnitten wird das Gehirn von zumeist adulten Tieren entnommen und mit Hilfe eines Vibratoms in sehr dünne Schichten geschnitten, in denen dann einzelne Zellen beispielsweise mittels der Patch-Clamp-Technik gemessen werden können (Papouin und Haydon 2018). Zur Messung isolierter, *in-vitro* kultivierter Primärneurone hingegen wird in der Regel nicht das Gehirn adulter,

sondern das Gehirn embryonaler oder neonataler Tiere entnommen und die darin vorliegenden Neurone über einen enzymatischen Verdau oder die mechanische Zerkleinerung des Gewebes zunächst vereinzelt. Diese werden dann, zumeist auf einem passenden Nährboden, ausgesät und vor der Durchführung der Messungen für mehrere Tage (*days in vitro*, DIV) auswachsen gelassen (Beaudoin et al. 2012). Während dieser Zeit differenzieren die isolierten Neurone und bilden funktionelle synaptische Verbindungen untereinander aus, sodass ein funktionelles *in-vitro* Netzwerk entsteht (Beaudoin et al. 2012).

Durch die Verwendung dieser neuronalen Modellsysteme konnte gezeigt werden, dass TPM eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanäle beeinflusst (Shank und Maryanoff 2008). So konnte durch die Untersuchung der TPM-Wirkung an präparierten Gehirnschnitten nachgewiesen werden, dass TPM die Ausbildung des cholinergen Plateaupotenzials hemmt (Palmieri et al. 2000, Kuzmiski et al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass TPM einen stimulierenden Einfluss auf spannungsabhängige Kaliumkanäle und einen hemmenden Einfluss auf spannungsabhängige Calcium- und Natrium-Kanäle besitzt (Zhang et al. 2000, Herrero et al. 2002, Curia et al. 2004, Kuzmiski et al. 2005). Der hemmende Einfluss von TPM auf Natriumkanäle wurde allerdings nicht nur an Hirnschnitten, sondern auch an *in-vitro* kultivierten Primärneuronen nachgewiesen (Zona et al. 1997). Zudem konnte an den kultivierten DIV-Neuronen gezeigt werden, dass TPM sowohl erregende AMPA- und Kainat-induzierte Calciumströme hemmt, als auch hemmende GABA-induzierte Ströme potenziert (White et al. 1997, Gibbs et al. 2000, White et al. 2000, Ängelagen et al. 2004, Poulsen et al. 2004, Ängelagen et al. 2005). Neben der Verwendung solcher murinen neuronalen Zellsysteme wurde die Wirkung von TPM auf das GABAerge System auch an rekombinant exprimierten GABA-Rezeptoren auf *Xenopus laevis* Oocyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der stimulierende Einfluss von TPM in Abhängigkeit vom Aufbau der GABA Rezeptoren steht und nur bei einigen Unterformen auftritt (Gordey et al. 2000, Simeone et al. 2006).

Trotz dieser umfassenden Untersuchungen zur Aufklärung der durch TPM beeinflussten neuronalen Systeme ist der genaue Wirkmechanismus, auf dem die Beeinflussung aller genannten Zielstrukturen durch TPM basiert, bis heute noch immer vollkommen unbekannt. Das ist auch der Grund, weshalb die Zielstrukturen von TPM in Abbildung 4 auch nur als „wahrscheinlich (*probable*)“ oder „möglich (*possible*)“ eingetragen sind (Louis 2009). Im Gegensatz zu den Wirkmechanismen anderer antiepileptischer Wirkstoffe kommt eine direkte Bindung oder Interaktion von TPM an die genannten Zielstrukturen als möglicher Wirkmechanismus nicht in Betracht. Das liegt zum einen daran, dass TPM eine Vielzahl potenzieller Zielstrukturen besitzt und somit universelle Binde- oder Interaktionseigenschaften aufweisen müsste. Zum anderen konnten bisher auch noch keine Interaktionen oder Bindungen von TPM an die beeinflussten Rezeptoren oder Kanäle experimentell nachgewiesen werden (Shank und Maryanoff 2008).



Aus diesem Grund ist es möglich, dass die Wirkung von TPM möglicherweise nicht primär über eine direkte Interaktion mit Rezeptoren oder Kanälen vermittelt wird, sondern vielmehr auf einer Beeinflussung von Komponenten zentraler intrazellulärer regulatorischer Signalkaskaden beruht, über die dann die Signaltransmissionen über alle beschriebenen Rezeptoren und Kanäle moduliert werden. Erste Hinweise darauf geben beispielsweise Forschungsarbeiten, die zeigen konnten, dass die Wirkung von TPM mit dem Vorliegen von Proteinphosphorylierungen in Neuronen im Zusammenhang steht (Ängelhagen et al. 2004, Ängelhagen et al. 2005, Curia et al. 2004, Gibbs et al. 2000). Auch ein Einfluss von TPM auf Proteinacetylierungen konnte bereits nachgewiesen werden (Eyal et al. 2004). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass TPM eine Hemmung von Carboanhydrasen hervorrufen kann, was möglicherweise auch mit den vielfältigen Wirkungseigenschaften von TPM in Verbindung stehen kann (Dodgson et al. 2000, Shank et al. 2005). Trotz dieser ersten vielversprechenden Hinweise darauf, dass die Wirkung von TPM möglicherweise mit einer Beeinflussung intrazellulärer Prozesse in Verbindung steht, wurden diese Ideen bis heute jedoch nicht umfassend weiterverfolgt.

Eine weitere offene Frage in Bezug zum genauen Wirkmechanismus von TPM ist, wie und ob sich das Zusammenspiel zwischen Erregung und Hemmung in neuronalen Netzwerken möglicherweise auch auf die Wirkung von TPM auswirkt. In den bereits genannten bisherigen Forschungsarbeiten wurde die Wirkung von TPM auf das erregende oder auf das inhibierende System jeweils nur getrennt voneinander untersucht (Shank und Maryanoff 2008). Allerdings treten Erregung und Hemmung im physiologischen Umfeld neuronaler Netzwerke niemals getrennt voneinander auf. Erregung und Hemmung sind jederzeit eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig (Bhatia et al. 2019, He und Cline 2019). Aus diesem Grund ist es unbedingt notwendig, dieses Zusammenspiel auch bei der Analyse der Wirkungseigenschaften eines neuromodulativen Wirkstoffes wie TPM zu berücksichtigen. Da TPM als bimodaler Wirkstoff sowohl Bereiche der Erregung, als auch der Inhibition beeinflusst, ist es durchaus möglich, dass das Zusammenspiel von Erregung und Inhibition seinerseits auch die Wirkung von TPM beeinflusst.

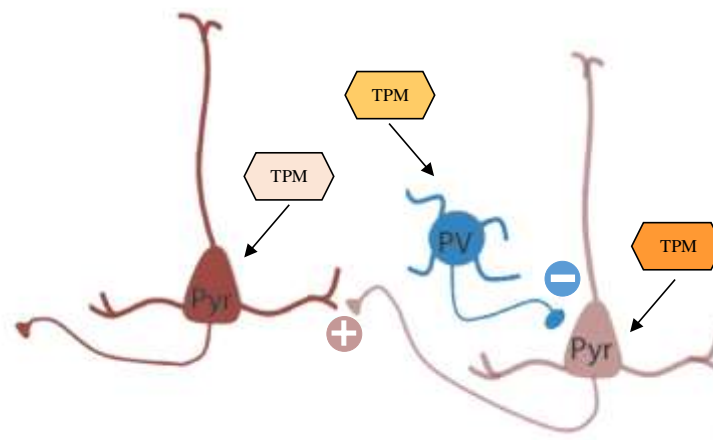
### **1.3.2 Die Analyse der TPM-Wirkung auf Einzelzellebene als neue Strategie zur Aufklärung der Wirkungseigenschaften**

Die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus von TPM in Bezug auf eine mögliche Beteiligung intrazellulärer Signalkaskaden und dem physiologischen Zusammenspiel von Erregung und Hemmung, stellt dabei eine sehr komplexe Fragestellung dar, deren Beantwortung möglicherweise durch die bisher verwendeten neuronalen Modellsysteme zusätzlich erschwert wird.

Wie bereits beschrieben, wurden die meisten *in vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von TPM bisher an neuronalen Netzwerken oder Netzwerk-ähnlichen Strukturen, wie *in-vitro* kultivierten Primärneuronen,

durchgeführt (Verstraelen et al. 2014, Verstraelen et al. 2018). Das Vorliegen der gemessenen Zellen in einem funktionellen Netzwerkverbund bietet dabei natürlich den Vorteil, dass die Neurone in einem physiologischen Umfeld gemessen werden können, erschwert gleichzeitig allerdings auch die Interpretation der Ergebnisse.

Das hängt damit zusammen, dass ein Wirkstoff wie TPM in einem Netzwerk grundsätzlich alle vorliegenden Zelltypen beeinflussen kann. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Zelltypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen auch hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanälen deutlich voneinander (vgl. Abbildung 2). Da gezeigt werden konnte, dass TPM eine Reihe verschiedener Rezeptoren und Kanäle beeinflussen kann, kann sich auch die Wirkung von TPM an den unterschiedlichen Zelltypen -abhängig von ihrer jeweiligen Ausstattung- voneinander unterscheiden. Hinzu kommt, dass nicht immer zweifelsfrei bestimmt werden kann, ob die nachgewiesene Wirkung von TPM primär durch die Beeinflussung der gemessenen Zelle selbst oder sekundär durch eine Beeinflussung des Netzwerkes und der benachbarten Zellen zustande kommt (Abbildung 6). Somit kann sich die Aufklärung des genauen Wirkmechanismus und die Identifizierung von zentralen intrinsischen Regulationsprozessen, die durch TPM beeinflusst werden, in Netzwerk-Modellsysteme sehr komplex gestalten.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der möglichen Wirkung von TPM in einem Netzwerkverbund**

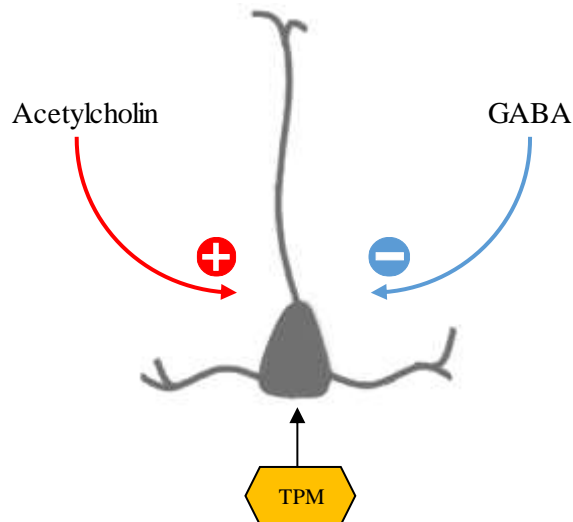
TPM kann in einem Netzwerk aus unterschiedlichen, erregenden und hemmenden, Zelltypen jede vorliegende Zelle beeinflussen. Die Wirkung von TPM hängt auch von der jeweiligen Ausstattung der Zelle mit verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanälen ab. „Pyr“ = Pyramidenzellen, „PV“ = Paravolumin-positives Interneuron.

Entsprechende Hinweise darauf, dass die Analyse der Wirkungseigenschaften von TPM an Netzwerkstrukturen tatsächlich sehr komplex sein kann, finden sich bei näherer Betrachtung bereits in früheren Forschungsarbeiten. So konnte beispielsweise die Wirkung von TPM auf die Kainat-induzierte Cobaldaufnahme nur an Neuronen nachgewiesen werden, welche 11 Tage *in-vitro* kultiviert wurden,

nicht aber an Neuronen, welche über 13 Tage kultiviert wurden (Skradiski und White 2000). Auch die starke Abhängigkeit der TPM-Wirkung vom Aufbau der GABA-Rezeptoren, wie sie von Gordey et al. (2000) und Simeone et al. (2006) nachgewiesen wurde, zeigt, wie sehr die Rezeptor- und Ionenkanalausstattung der Zellen die Wirkung von TPM beeinflussen kann.

Um die genannten Probleme, die bei der Messung von Neuronen in Netzwerkmodellen auftreten können, zu umgehen und so die Analyse der Wirkungseigenschaften von TPM zu vereinfachen, wird im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit ein anderer Versuchsansatz gewählt: die Untersuchung der TPM-Wirkung auf Ebene von einzelnen Neuronen. Bereits in vielen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass einzelne Neurone alle notwendigen physiologischen Eigenschaften aufweisen, um als Modellsystem für neurobiologische Fragestellungen verwendet werden zu können (Cash und Hochberg 2016). Einzelne Neurone können eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitterrezeptoren exprimieren und sich dabei auch homöostatisch und plastisch an veränderte Erregungszustände anpassen (Marder et al. 2014).

In dieser Arbeit wird die humane Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y als Einzelzell-Modellsystem verwendet. Diese Zelllinie wird bereits seit langem als Zellsystem zur Untersuchung neurobiologischer Fragestellungen und Erkrankungen verwendet und weist eine umfangreiche Ausstattung mit Strukturen aller wichtiger Transmittersysteme und Ionenkanäle auf (Agholme et al. 2010, Kovalevich und Langford 2013, Xicoy et al. 2017). Die Verwendung dieser klonalen Zelllinie ermöglicht es, den Einfluss von TPM auf die Signaltransmission auf Einzelzellebene zu analysieren, ohne den Einfluss eines neuronalen Netzwerkes berücksichtigen zu müssen. So können die nachgewiesenen Effekte direkt auf die Beeinflussung der einzelnen Zelle zurückgeführt werden und so die Grundlage für spätere, erweiterte Untersuchungen bilden. Zudem weisen Zellen einer solchen klonalen Zelllinie im Vergleich zu isolierten Primärzellen eine eher homogene Rezeptor- und Ionenkanalausstattung aus und können über kurze Zeiten kultiviert werden, sodass keine umfassenden physiologischen Unterschiede der Zelle zwischen den einzelnen Versuchen zu erwarten sind. Darüber hinaus lässt sich mit Hilfe dieses Einzelzell-Modellsystems auch der Einfluss des Zusammenspiels von Erregung und Hemmung auf die TPM-Wirkung analysieren. Verschiedene erregende und hemmende Neurotransmitter können in flexiblen Zeitabständen zur Stimulation zu den Zellen zugegeben werden. Da die Zellen nicht in einem Netzwerk vorliegen, lässt sich dabei direkt der Einfluss der erregenden und hemmenden Stimulation auf das jeweilige einzelne Neuron nachweisen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Analyse der Wirkungseigenschaften von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA im Einzelzell-Modellsystem**

Der Fokus der hier durchgeführten Untersuchungen liegt dabei auf der Analyse der Wirkung von TPM auf das cholinerge System mit Hilfe von Calcium-Imaging Experimenten. Dabei soll die TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ermittelt werden. Obwohl Acetylcholin den zweitwichtigsten erregenden Neurotransmitter im menschlichen Gehirn darstellt, wurde die Wirkung von TPM auf das cholinerge System bisher noch kaum untersucht. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass TPM das cholinerge Plateaupotenzial hemmt, ein spezielles Phänomen, welches auftritt, wenn Neurone in Anwesenheit von muskarinen Agonisten depolarisiert werden (Kuzmiski et al. 2005, Palmieri et al 2000). Weitere Aspekte der Wirkung von TPM auf das cholinerge System sind noch unbekannt. Da das cholinerge System in seiner wichtigen Funktion als Neuromodulator allerdings einen direkten Einfluss auf die erregende und hemmende Signaltransmission in neuronalen Netzwerken besitzt, könnte die Beeinflussung dieses Systems durch TPM einen zentralen Aspekt der Wirkungseigenschaften von TPM darstellen. Die Aufklärung des Wirkmechanismus von TPM hinsichtlich des cholinergen Systems kann nicht nur dabei helfen, bessere Einblicke in die Wirkungsweise von TPM zu erlangen, sondern kann darüber hinaus auch zum besseren Verständnis der intrinsischen Regulation der cholinergen Signaltransmission beitragen.

## 2 Zielsetzung

Der Wirkstoff Topiramate (TPM) wird erfolgreich zur Behandlung unbalancierter neuronaler Netzwerke eingesetzt und besitzt die besondere Eigenschaft, sowohl die erregende, als auch die hemmende Signaltransmission zu beeinflussen. Durch die intensive Forschung der letzten Jahre konnten gezeigt werden, dass TPM die Signaltransmission einer Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und Ionenkanäle beeinflusst. Allerdings ist sowohl der genaue Wirkmechanismus von TPM, als auch der mögliche Einfluss des physiologischen Zusammenspiels von Erregung und Hemmung auf die TPM-Wirkung, noch immer unverstanden.

Da TPM eine Vielzahl verschiedener Signaltransmissionssysteme beeinflusst, ohne dass jemals eine direkte Interaktion von TPM mit den jeweiligen Zielstrukturen nachgewiesen werden konnten, stellt eine TPM-induzierte Beeinflussung zentraler, intrinsischer Regulationsprozesse einen potenziellen molekularen Wirkmechanismus von TPM dar.

Diese Hypothese zum möglichen Wirkmechanismus von TPM soll im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit hinsichtlich der Wirkung von TPM auf die cholinerge Signaltransmission detailliert untersucht werden. Um die Analyse und die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse zu vereinfachen, werden die Untersuchungen dabei nicht, wie in bisherigen Forschungsarbeiten, an Neuronen in einem Netzwerkverbund, sondern, durch die Verwendung der humanen Neuroblastozelllinie SHSY-5Y, auf Ebene von Einzelzellen durchgeführt.

Da bisher noch keine umfassenden Daten zur Wirkung von TPM auf das cholinerge System vorliegen, wird zunächst, mit Hilfe von Calcium-Imaging Experimenten, die Wirkung von TPM auf Acetylcholin-induzierte Calciumsignale analysiert. Um erstmals auch die Bedeutung des Zusammenspiels von Erregung und Inhibition für die Ausbildung TPM-Wirkung genauer zu untersuchen, wird zudem auch die Wirkung von TPM auf Acetylcholin-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA untersucht. Daran anschließend werden die durch TPM beeinflussten, intrinsischen Regulationsprozesse analysiert, die der Wirkung von TPM auf die Acetylcholin-induzierten Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA zu Grunde liegen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

(-)-Nikotin	Sigma Aldrich, München
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München
Acetylcholinchlorid	Sigma Aldrich, München
Actinomycin D	Cayman Chemical, Michigan
all-trans retinoic acid (Retinalsäure)	Sigma Aldrich, München
Anisomycin	Cayman Chemical, Michigan
BCIP	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München
BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V)	PAA,Österreich
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Sigma Aldrich, München
Cycloheximid	Cayman Chemical, Michigan
DAPI	Sigma Aldrich, München
DEPC-H <sub>2</sub> O	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	ZChL, Saarbrücken
Emetin (Hydrochlorid-Hydrat)	Cayman Chemical, Michigan
Ethanol (70%, 99%)	ZChL, Saarbrücken
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, München
F-12 (1x) Nutrient Mixture (Ham)	Gibco life science / Thermo fisher scientific, Schwerte
FCS (fetal calf serum)	Gibco / Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Fluo-4 AM	Invitrogen / Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Formalin (40%)	ZChL, Saarbrücken
Forskolin	Cayman Chemical, Michigan
GABA (γ-Aminobuttersäure)	Sigma Aldrich, München
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma Aldrich, München
Glucose	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Sigma Aldrich, München
Glycogen	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid )	Carl Roth, Karlsruhe
Inauhzin	Sigma Aldrich, München
Isopropanol	ZChL, Saarbrücken
KAPA SYBR FAST Universal	KAPA Biosystems
KCl (Kaliumchlorid)	AppliChem, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Grüssing, Filsum
L-Glutamine (200 mM)	Lonza, Basel
MEM (1x) Minimum Essential Medium	Gibco life science / Thermo fisher scientific, Schwerte
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Magnesiumchlorid)	AppliChem, Darmstadt
Muskarin-Chlorid	Sigma Aldrich, München
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Dinatriumhydrogenphosphat)	ZChL, Saarbrücken
NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Grüssing, Filsum
NB-Medium	Gibco life science / Thermo fisher scientific, Schwerte
NBT	AppliChem
NPP	AppliChem
OligoDT-Primer	Jena Bioscience
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München
Penicillin-Streptomycin (1%)	Sigma Aldrich, München
Puromycin (Hydrochlorid)	Cayman Chemical, Michigan
Revert Aid Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RP-cAMPs, Triethyl-Ammoniumsalz	Biolog, Bremen
SDS	Sigma Aldrich, München
Thapsigargin	Cayman Chemical, Michigan
Topiramat	Cayman Chemical, Michigan
Trichostatin A	Cayman Chemical, Michigan
Tri-Reagent Solution (Trizol)	Invitrogen
TRIS-HCl	Sigma Aldrich, München
Triton-X-100	UdS, ZchL
Trypanblau (0,4%)	Sigma Aldrich, München
Trypsin/EDTA (0,05%, 1X)	Gibco life science / Thermo fisher scientific, Schwerte

**3.1.2 Puffer und Verbrauchslösungen**

<b>1x PBS</b>	2,7 mM KCl 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
<b>1x PBST</b>	1 x PBS 0,1 % Triton
<b>1x PBST Hochsalz</b>	1 x PBS 0,5 % Triton 0,5 M NaCl
<b>4% Formalin</b>	1 x PBS 4 % Formalin
<b>5x Probenpuffer</b>	0,2 M Tris-HCl 10 mM 2-Mercaptoethanol 10% SDS 20% Glycerol 0,05% Bromphenolblau
<b>Blot-Puffer</b>	0,25 M Tris-HCl 0,2 M Glycin 20% Methanol aq.dest
<b>Färbelösung (Dot-Blot)</b>	0,1223 µM NBT in RxN 122,53 µM BCIP in DMSO
<b>Fluo-4 AM</b>	Stock: 1 mM, 100% DMSO Arbeitslösung: 2 µM, 0,2 % DMSO
<b>Human-Ringer (1x)</b>	130 mM NaCl 2,4 mM KCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O 1.3 mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O pH 7,4 10 mM Glucose



<b>Homogenisierungspuffer (ELISA)</b>	1 mM EDTA 1x PBS 5 mM Natriumbutyrat
<b>Blockpuffer (ELISA)</b>	1x PBS 1 % BSA
<b>Färbelösung (ELISA)</b>	1 mM p-NPP in RxN Puffer
<b>RxN Puffer</b>	1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,1 M Tris/HCl (pH 8,7)
<b>Natrium-Citratpuffer</b>	10 mM Tri-Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O 1x PBS
<b>Homogenisierungspuffer (Dot-Blot)</b>	1x PBS 2 mM EDTA
<b>SHSY-5Y Zellkulturmedium</b>	1 : 1 F12 / MEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,5 % GlutaMAX 0,1 % Gentamycin

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

10-Well-Silikonkammern	eigene Herstellung
3-Wege Hahn (#2-6351)	NeoLab
Deckgläser (24x24 mm)	Paul-Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Deckgläser (24x60 mm)	Paul-Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Durchfluss-Schläuche, Tygon	Saint-Gobain Performance, Charny, FR
Filterpapier, Protran	Whatman, Maidstone, GB
Nitrozellulosemembran (Amersham Protran 0,45 µm)	GE Healthcare, Chicago, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (5 ml)	Eppendorf, Wolmirstedt
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schlauch mit Abstandshalter	Saint-Gobain Performance, Charny, FR

serologische Pipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio One / Sarstedt
Silikon-Durchflusskammern	eigene Herstellung
Silikonpaste, Korasilon-Paste, hochviskos	Kurt Obermeier GmbH, Bad Berleburg-Raumland
Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht,
Unterlegscheiben, Plastik, Schwarz	Baumarkt Saarbrücken
Verbinder beidseitig (#2-1800)	NeoLab
Verbinder Luer L, männlich (#2-1880)	NeoLab
Verbinder Luer, weiblich (#2-1886)	NeoLab
Zellkulturflaschen (25/75cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6/12/24/96 Well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	VWR, Darmstadt

### 3.1.4 Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>			
H3K18ac (Acetyl-Histone H3 (Lys 18))	Rabbit	Sigma Aldrich, München (#720095)	1:1000
H3K9ac (Acetyl-Histone H3 (Lys9))	Rabbit	Sigma Aldrich, München (#SAB4500347)	1:1000
Anti-Puromycin	Mouse	EMD Millipore (#MABE343)	1: 10000
p-Sirt1	Rabbit	Cell Signaling (#2314)	1:100
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Anti-rabbit-IgG – Alkalische Phosphatase	Goat	Sigma Aldrich, München (#A3687)	1:4000
Anti-mouse-IgG – Alkalische Phosphatase	Goat	Sigma Aldrich, München (#A3562)	1:4000
Anti-rabbit-IgG – Cy3	Goat	Jackson-Immuno Research (111-165-144)	1:1000

### 3.1.5 Primer

Target	Forward	Reverse
$\alpha$ 3-nAChR (NM_000743.5)	TGAAGCCAAAGAGATTCAAGATGA	CTGCCCTGACACAAGGAAGT
$\alpha$ 4-nAChR (NM_000744.6)	GCTCAGCTCATTGACGTGGA	TCAGCATTGTTGTAGAGGACGA

$\alpha$ 5-nAChR (NM_000745.3)	CTTCCCAAAGCTGCTTTGCATGA	CAATCTTCAACAACCTCACGGA
$\alpha$ 7-nAChR (NM_000746.5)	TACCGTCTTCATGCTGCTCG	TCTGGTCCACTTGGGCATCT
$\beta$ 2-nAChR (NM_000748.2)	AACAATGCTGACGGCATGTACG	CAAGTCGATCTCTGTGCGGT
$\beta$ 4-nAChR (NM_000750.5)	CATGTACTTTGTGAACCCCGC	CCTCAACGACACTCTGGTCTT

### 3.1.6 Geräte

2-Wege-Wälzpumpe (ISM849)	Ismatec, Wertheim
CFX Connect Real Time System	Bio Rad
Einkanalpipette (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l)	Brand, Wertheim
Heizblock	Abimed, Langenfeld
Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate	Tecan, Männedorf, Schweiz
Kamera (Calcium-Imaging, Retiga R1)	Teledyne Technologies, Kalifornien, USA
Kamera (Immunhistologie, Retiga R6)	Teledyne Technologies, Kalifornien, USA
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Wolmirstedt
Lichtquelle Fluoreszenzmikroskop (EL6000)	Leica, Wetzlar
Mehrkanalpipetten (50 $\mu$ l, 200 $\mu$ l)	Brand, Wertheim
Mikroskop (Calcium-Imaging, Leica DMIL LED)	Leica, Wetzlar
Mikroskop (Immunhistologie, Leica DMI8)	Leica, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	P. Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter (inoLab ph730)	WTW, Weilheim
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank	Nuaire, Plymouth
Tischzentrifuge (Spectrafuge)	Labnet, Berlin
Vortex VX 100	Labnet, Berlin
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Nuaire, Plymouth
Wärmplatte (RCT basic)	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Labnet, Berlin
Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf, Wolmirstedt

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y

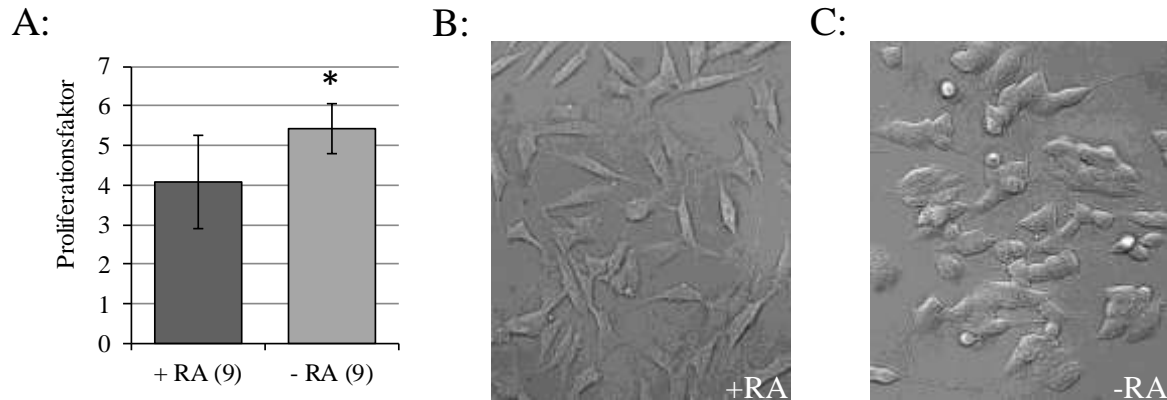
Die verwendete Zelllinie SHSY-5Y wurde in 75cm<sup>2</sup> oder 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Zellkulturmedium ist ein 1:1 Mix aus F12 und MEM, zu dem 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.5% GlutaMAX und 0.1% Gentamycin zugegeben werden. Bei der Verwendung der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y ist darauf zu achten, dass alle Lösungen, die in Kontakt mit vitalen Zellen kommen, vor der Verwendung auf 37°C im Wasserbad oder im Wärmeschrank vorgewärmt werden. Um eine optimale Kultivierung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Zellkulturmedium alle 2-3 Tage erneuert. Zudem wurde darauf geachtet, dass eine gute Wachstumsdichte der Zellen vorliegt. Zellen der Zelllinie SHSY-5Y wachsen überwiegend adhären am Boden der Zellkulturflaschen. Da eine zu hohe Zelldichte die Vitalität der Zellen beeinträchtigt, wurden die Zellen beim Erreichen eines 80-90% konfluenten Wachstums, also in der Regel ein- bis zweimal die Woche, ausgedünnt und in frische Zellkulturflaschen umgesetzt (passagiert). Zum Umsetzen wurden die Zellen zunächst von der Wachstumsfläche abgelöst. Dazu wurde das Medium von den Zellen vollständig abgenommen und durch 2-5 ml Trypsin/EDTA (TE, 0,05%) ersetzt, welches für 3 Minuten auf den Zellen im Wärmeschrank inkubiert wurde. Trypsin wirkt proteolytisch und EDTA wirkt als Chelator, was die Adhäsion der Zellen reduziert und zum Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche der Zellkulturflaschen führt. Dieser Prozess wurde nach drei Minuten durch Zugabe von Zellkultur-Medium abgestoppt, um die Zellen nicht zu schädigen. Das im Medium enthaltene Serum hebt die enzymatische Wirkung von Trypsin dabei auf. Die Mischung aus TE und Zellkulturmedium wurde dann zur Gewinnung der abgelösten Zellen zunächst 3 Minuten bei 1100\*g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet zunächst in 1 ml frischem Zellkulturmedium vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte durch Zugabe von weiterem Medium verdünnt. Die so verdünnte Zellsuspension wurde dann in frische Zellkulturflaschen, in denen bereits frisches Zellkulturmedium vorgelegt wurde, überführt.

Wenn die Zellen zur Durchführung von Experimenten auf andere Wachstumsflächen, wie Deckgläser oder Zellkulturplatten überführt werden mussten, wurden die Zellen zunächst wie beschrieben aus den Zellkulturflaschen mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Nach der Zentrifugation und Resuspension der Zellen in frischem Medium wurden dann die Zellzahl der Suspension bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau 1:1 gemischt. Trypanblau ist ein nicht-membrangängiger Farbstoff, welcher nur tote Zellen ohne intakte Zellmembran anfärbt, sodass vitale Zellen nicht angefärbt werden. Über diese Färbung kann der Anteil vitaler Zellen in der Suspension bestimmt werden. Von der Mischung wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl vitaler Zellen ausgezählt. Danach wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension, welches die benötigte Zellzahl enthält, entnommen und auf die für die einzelnen Versuche benötigten Wachstumsflächen

(Zellkulturplatten, Deckgläser etc.) ausgesät. Der Rest der Zellsuspension konnte dann wieder mit frischem Medium zurück in die Zellkulturflasche ausgesät werden.

### **3.2.1.1 Ausdifferenzierung der humanen Neuroblastozelllinie SHSY-5Y**

Die Ausdifferenzierung der Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kovalevich und Langford, 2013. Zur Ausdifferenzierung wurden Zellen, die nach dem Standard-Protokoll kultiviert wurden, zunächst aus den Zellkulturflaschen abgelöst und auf 12-Well Platten (200.000 Zellen/Well) oder direkt auf Deckgläser (30.000 Zellen/Deckglas) zum Calcium-Imaging ausgesät (Tag 0). Nachdem die Zellen über Nacht in den Zellkulturplatten oder auf den Deckgläsern angewachsen sind, wurde das normale Zellkulturmedium durch 1 ml frisches NB-Medium ersetzt, zu dem 10  $\mu\text{M}$  Retinalsäure zugegeben wurden (Tag 1). Das Medium wurde jedes Mal frisch angesetzt und dunkel aufbewahrt, da Retinalsäure stark lichtempfindlich ist. An Tag 3 wurde dann ein weiterer Mediumwechsel mit frischem NB-Medium + 10  $\mu\text{M}$  Retinalsäure durchgeführt. An Tag 5 ist die Differenzierung abgeschlossen und die Zellen können verwendet werden. Die Zellen, die auf den Deckgläsern ausdifferenziert wurden, wurden zur Durchführung von Calcium-Imaging Experimenten verwendet. Die Zellen, welche in den 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert wurden, wurden dazu verwendet, den Proliferationsfaktor ausdifferenzierter und undifferenzierter Zellen als Nachweis der erfolgreichen Differenzierung zu bestimmen. Dazu wurden sowohl die ausdifferenzierten, als auch die nicht-differenzierten Zellen mit Hilfe von Trypsin/ETDA nach dem Standardprotokoll von der Wachstumsfläche der 12-Well-Platte abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Da eine erfolgreiche Ausdifferenzierung der Zellen mit einer Reduktion der Proliferationsfähigkeit einhergeht, wurde der Proliferationsfaktor differenzierter und nicht-differenzierter Zellen berechnet und statistisch verglichen (Kovalevich und Langford 2013). Der Proliferationsfaktor errechnet sich aus dem Quotienten der Zellzahl nach fünftägiger Ausdifferenzierung zur Zellzahl zu Beginn der Ausdifferenzierung (200.000 Zellen). Es konnte gezeigt werden, dass der Proliferationsfaktor ausdifferenzierter SHSY-5Y Zellen, also solcher, die mit Retinalsäure kultiviert wurden („+RA“) signifikant niedriger ist, als der von undifferenzierten Zellen (Abbildung 8, A). Zudem wurden von allen Zellen mikroskopische Durchlichtaufnahmen erstellt, um Veränderungen der Morphologie als weiteren Marker für die erfolgreiche Ausdifferenzierung zu dokumentieren. Dabei war zu erkennen, dass die ausdifferenzierten Zellen (Abbildung 8, B) deutlich längere Zellfortsätze und einen erkennbar längeren Zellkörper ausgebildet haben, als die undifferenzierten Zellen (Abbildung 8, C). Zusätzlich zum reduzierten Proliferationsfaktor spricht auch die veränderte Morphologie für eine erfolgreiche Ausdifferenzierung der SHSY-5Y Zellen.



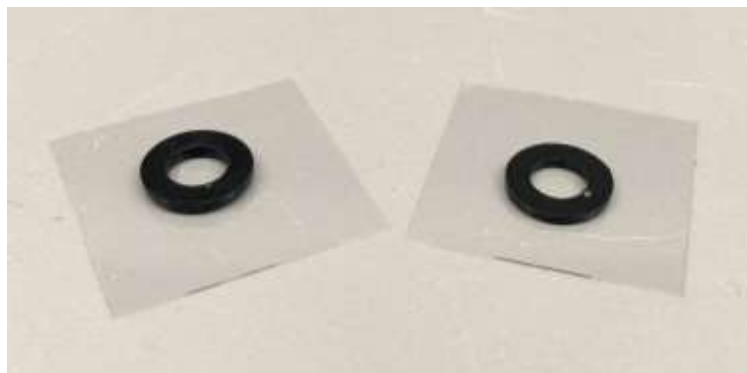
**Abbildung 8: Proliferationsfaktor ausdifferenzierter und undifferenzierter SHSY-5Y Zellen (A) und mikroskopische Aufnahmen (B, C)**

A: Nach einer 5-tägigen Behandlung der SHSY-5Y Zellen mit oder ohne Retinsäure wurde die Zellzahl ermittelt und der Proliferationsfaktor berechnet. Anzahl gemessener Proben in Klammern. Statistik: T-Test, zweiseitig, ungepaart. p-Wert : 0,01. B, C: Durchlichtaufnahmen differenzierter (+RA) und undifferenzierter Zellen (-RA), Belichtungszeit 100ms, 200-fache Vergrößerung.

### 3.2.2 Calcium-Imaging Experimente

#### 3.2.2.1 Vorbereitung der Deckgläser zur einmaligen Stimulation der Zellen

Zur Messung des ACh-induzierten Calciumeinstroms während der einmaliger Stimulation der SHSY-5Y Zellen wurden die Zellen auf Glasdeckgläsern (24x24mm) kultiviert (Abbildung 9). Um eine abgeschlossene Wachstumsfläche für die Zellen zu bilden, wurde mit hochviskoser Silikonpaste auf jedes Deckglas ein kleiner schwarzer Plastikring in Form einer kleinen Unterlegscheibe befestigt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Glasdeckgläschen, auf denen die Wachstumsfläche der Zellen mit Hilfe eines schwarzen Plastikringes begrenzt ist**

Zur Vorbereitung wurden die Deckgläser und die Plastikringe zunächst mit 99% Ethanol gesäubert und entfettet. Nachdem das Ethanol vollständig getrocknet war, wurde auf einer Seite der Plastikringe eine

dünne Schicht Silikonpaste aufgebracht und die Ringe dann in der Mitte der Deckgläser befestigt. Die so vorbereiteten Deckgläser wurden bis zur Verwendung in einer Petrischale im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Bevor auf den vorbereiteten Deckgläsern Zellen ausgesät wurden, wurde die benötigte Anzahl an Deckgläsern aus dem Kühlschrank entnommen und für 15 Minuten im Wärmeschrank auf 37°C vorgewärmt.

Für die Calcium-Imaging Messungen nach einmaliger Stimulation wurden pro Deckglas 30.000 Zellen in 35 µl Zellkulturmedium ausgesät. Die Deckgläser mit den ausgesäten Zellen wurden dann in einer Petrischale über Nacht bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank kultiviert, sodass die Zellen am Glas anwachsen konnten. Damit das Zellkulturmedium auf den Deckgläsern in dieser Zeit nicht austrocknet, wurde zur Befeuchtung der Schale ein mit destilliertem Wasser benetztes Papiertuch in die Petrischale gelegt.

### 3.2.2.2 Vorbereitung der Durchflussskammern zur Durchführung der multiplen Stimulation der Zellen

Zur Messung des ACh-induzierten Calciumeinstroms während der multiplen Stimulation der SHSY-5Y Zellen wurden die Zellen in Durchflussskammern kultiviert. Die Durchflussskammern bestehen aus dem Durchflussaufsatz aus Silikon, der auf ein dünnes, 24x60 mm großes Deckglas, welches als Wachstumsfläche für die Zellen dient, gesetzt wird (Abbildung 10).

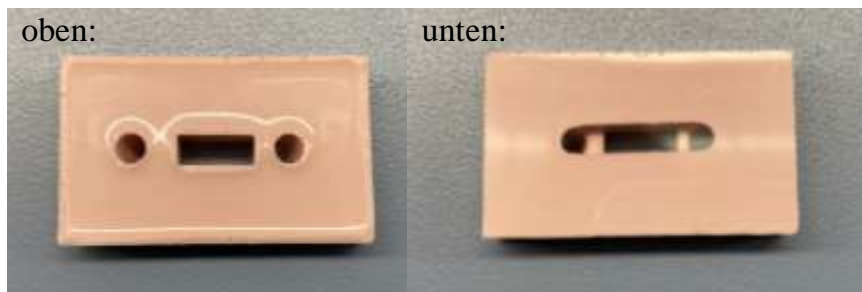


Abbildung 10: Ober- und Unterseite der Durchflussskammern

Vor dem Zusammenbau wurde der Aufsatz und das Deckglas zur Reinigung und Entfettung in 99% EtOH geschwenkt und bis zur vollständigen Verdunstung des Alkohols trocknen gelassen. Danach wurde die Durchflussskammer über festes Andrücken auf dem Deckglas befestigt. Die vorbereiteten Durchflussskammern konnten bis zur jeweiligen Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Vor der Aufbringung der Zellen müssen die Kammern bei der Verwendung mit SHSY-5Y Zellen auf 37°C vorgewärmt werden.

Für die Calcium-Imaging Experimente wurden 50.000 Zellen in 300 µl Zellkulturmedium ausgesät. Die Kammern wurden ebenfalls über Nacht in einer Petrischale im Wärmeschrank (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) aufbewahrt, sodass die Zellen auf den Deckgläsern der Durchflusskammern anwachsen konnten.

### 3.2.2.3 Allgemeiner Versuchsaufbau der Calcium-Imaging Experimente

Nachdem die Zellen über Nacht auf den Deckgläsern oder in den Durchflusskammern angewachsen sind, werden sie am nächsten Tag für die Calcium-Imaging Experimente verwendet. Die Durchführung gliedert sich dabei in drei verschiedene Schritte: die Beladung der Zellen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-4-AM, die intrinsische Aktivierung des Farbstoffes mit paralleler Vorbehandlung der Zellen mit den verschiedenen Behandlungslösungen und die eigentliche Messung der Calcium-Signale (Abbildung 11).

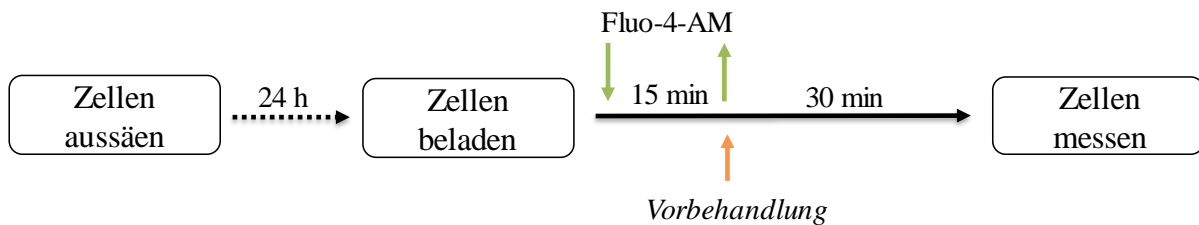


Abbildung 11: Schematische Übersicht über die zeitlichen Abläufe der Calcium-Imaging Experimente

#### Die Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM und die Aktivierung des Farbstoffes

Zur Beladung der Zellen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-4-AM wurde zunächst das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und durch 35 µl (einmalige Stimulation) / 150 µl (multiple Stimulation) Fluo-4-AM (2 µM, 0,2% DMSO, in Ringer) ersetzt. Der Farbstoff wurde für 15 Minuten auf den Zellen inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen, da Fluo-4-AM aufgrund seiner chemischen Struktur und dem Vorliegen der Acetoxymethylester-Gruppe (AM) über die Zellmembran ins Zellinnere diffundieren kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Fluo-4-AM Lösung von den Zellen abgenommen und durch 35 µl (einmalige Stimulation) / 150 µl (multiple Stimulation) Ringer ersetzt, welcher für weitere 30 Minuten auf den Zellen inkubiert wird. In diesem Zeitfenster werden die Acetoxymethylester-Gruppe des Farbstoffes durch intrinsische Esterasen abgespalten, was dazu führt, dass der Farbstoff seine Membranpermeabilität verliert und somit in den Zellen verbleibt. Bei Versuchen, bei denen die Zellen für 30 Minuten vorbehandelt wurden, wurde diese Vorbehandlung in dem 30-minütigen Zeitfenster während der intrazellulären Aktivierung des Farbstoffes durchgeführt. Dazu wurden die Fluo-4-AM Lösung nach den ersten 15 Minuten dann nicht durch pure Ringerlösung, sondern durch Ringerlösung mit darin gelösten Wirkstoffen, ersetzt. Nach Durchführung dieses 45-minütigen Protokolls zur



Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM konnte mit der Messung der Calcium-Signale an vorbereiteten SHSY-5Y Zellen begonnen werden.

#### **3.2.2.4 Messablauf der einmaligen Stimulation der SHSY-5Y Zellen**

Die Deckgläser mit den mit Fluo-4-AM beladenen Zellen wurden am Mikroskop (Leica DMIL LED) gemessen. Dazu wurden die Deckgläser in eine Plexiglasschale platziert. Die Schale besitzt eine Öffnung auf der Unterseite, sodass das Fluoreszenzlicht ungehindert auf das Deckglas treffen kann. Bei 200-facher Vergrößerung wurde zunächst im Durchlicht ein passender Bildausschnitt gewählt und fotografiert (Belichtungszeit 100 ms, 2x2 Binning). Anschließend wurde von Durchlicht auf Fluoreszenzlicht mit einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm umgestellt und die Messung gestartet. Die Fluoreszenzmessung im stationären Messsystem besteht aus einer Videosequenz aus 120 im Abstand von 2 Sekunden aufgenommenen Einzelbildern (Belichtungszeit 100 ms) und besitzt somit eine Gesamtdauer von 240 Sekunden. Die Zugabe der Behandlungslösung erfolgte jeweils nach 60 Sekunden, die Stimulation der Zellen mit Acetylcholin erfolgte nach 120 Sekunden. Alle Applikationen erfolgten über die Zugabe von 5 µl der entsprechenden Behandlungs- oder Stimulationslösung.

#### **3.2.2.5 Technischer Aufbau des Durchflusssystems zur multiplen Stimulation**

Das Durchflusssystem ist so aufgebaut, dass ein Pumpensystem während der Messung und der Aufnahme der Bildsequenzen kontinuierlich frische Lösungen über die Zellen spült. Dazu werden die Zellen in Durchflusskammern ausgesät, die so aufgebaut sind, dass Anschlüsse von Zu- und Ablauf auf gegenüberliegenden Enden einer nach oben offenen Spülrinne liegen (Abbildung 10, Abbildung 12). Das Deckglas, auf dem die Zellen angewachsen sind, begrenzt die Kammer nach unten hin. Durch dieses Deckglas kann das Fluoreszenzlicht des verwendeten inversen Mikroskops von unten direkt auf die Zellen fallen; durch die nach oben offene Spülrinne können die Zellen zudem auch im Durchlicht betrachtet werden. Die Lösung, die die Zellen überspült, wird auf der einen Seite in die Kammer hineingepumpt, überspült die auf dem Deckglas angewachsenen Zellen, und wird auf der gegenüberliegenden Seite wieder abgesaugt. Die Durchflussgeschwindigkeit des Systems liegt bei 6 ml/min. Zu- und Ablaufschläuche sind gegenläufig in die Umwälzpumpe eingespannt, sodass bei gleicher Drehrichtung der Walze ein paralleles Pumpen und Absaugen möglich ist. Durch diesen Aufbau wird ein kontinuierlicher Durchfluss auf den Zellen gewährleistet, sodass zu jeder Zeit die gleiche Flüssigkeitsmenge durch die Kammer transportiert wird.

Durch eine Mehrwege-Magnetventilinsel ist es möglich, mehrere unterschiedliche Lösungen an dieses Pumpensystem anzuschließen (Abbildung 12). Die Steuerung der Magnetinsel geschieht elektronisch über ein Schaltelement mit einzelnen Knöpfen. Grundsätzlich sind zwei Flüssigkeitsreservoirs voneinander zu unterscheiden: die Spüllösung (Reservoir I) und die Stimulationslösung (Reservoir II). Das Reservoir

der Spüllösung stellt den Hauptzulauf dar und ist in mit der Magnetinsel so verschaltet, dass ein dauernder Zustrom aus dieser Lösung gewährleistet ist: wird kein Knopf gedrückt, werden die Zellen bei laufender Pumpe permanent mit der Spüllösung überspült. Durch Einbau eines Dreiwege-Hahns ist es möglich, zwei verschiedene Spüllösungen anzuschließen (z.B. Kontrolllösung und Behandlungslösung) und zwischen diesen, durch Drehen des Dreiwege-Hahns, zu wechseln. Die Stimulationlösungen können über Knopfdruck zugeschaltet werden. Wird ein Knopf gedrückt, so schließt sich der Hauptzulauf der Spüllösung und das Ventil der entsprechenden Stimulationlösung öffnet sich. Die Zellen werden dann für die Dauer des Knopfdrucks mit der Lösung aus dem Stimationsreservoir überspült. Die Konstruktion der Mehrwegeventilinsel erlaubt den Anschluss von bis zu drei Stimulationlösungen, die jeweils über eigene Knöpfe angesteuert werden können. Abbildung 12 fasst den Grundaufbau des Durchflusssystems noch einmal schematisch zusammen.

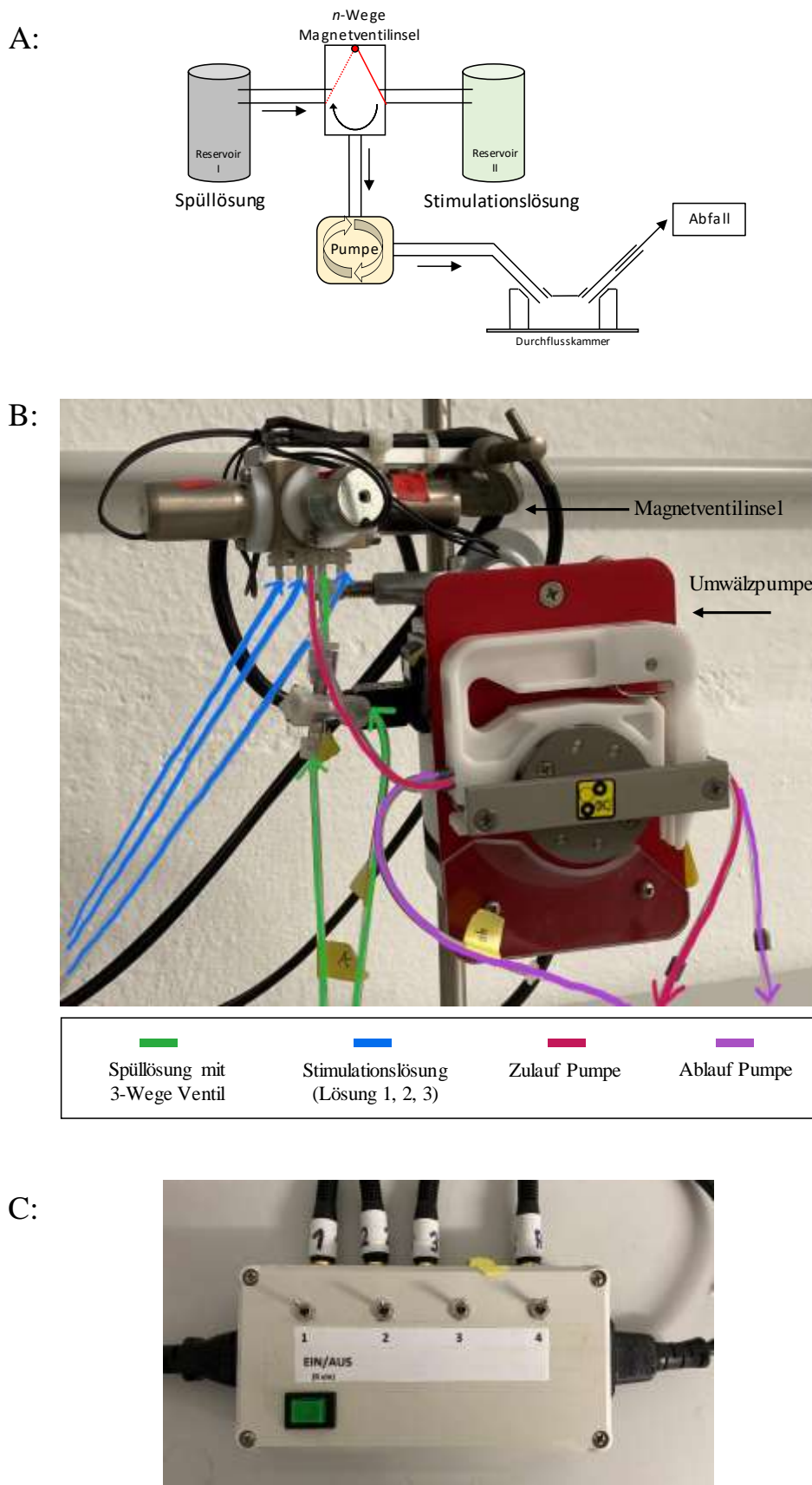


Abbildung 12: Schematischer (A) und technischer Aufbau (B) des Durchflusssystems mit Markierung aller Zu- und Abläufe (B) und Steuerungseinheit der Zuläufe (C)

Alle verwendeten Lösungen werden mit Hilfe eines temperierten Wasserbades während der Messung auf einer Temperatur von 37°C gehalten, damit die Zellen nicht durch zu geringe Temperaturen geschädigt werden. Zudem ist bei den Messungen im Durchflusssystem darauf zu achten, dass beim Ansaugen der Lösungen keine Luftblasen entstehen, da diese die Zellen von den Deckgläsern abspülen.

### **3.2.2.6 Messablauf bei der multiplen Stimulation der SHSY-5Y Zellen**

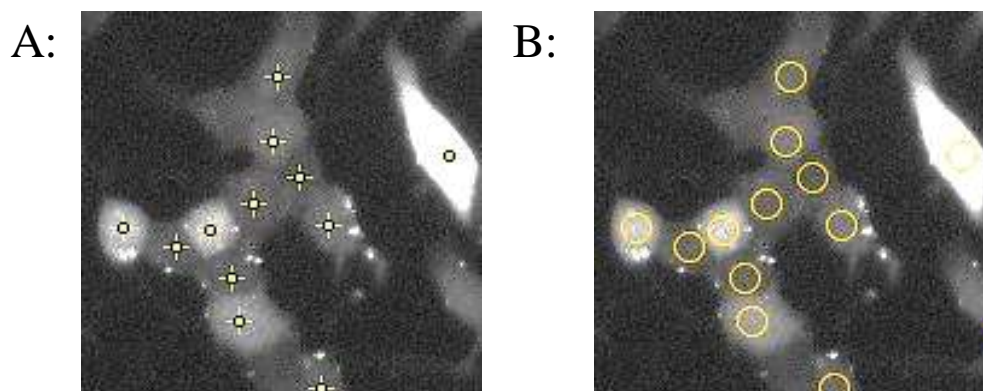
Vor der Durchführung der Messung wurde zunächst das Pumpsystem in Betrieb genommen. Dazu wurden alle Schläuche zunächst zu Beginn eines Versuchstages mit sauberem destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten gespült. Anschließend wurden die auf 37°C vorgewärmten verwendeten Lösungen bereitgestellt und alle Zulaufschläuche mit den jeweiligen Lösungen beladen. Sobald die Beladung der Zellen mit Fluo-4, und die -je nach Versuch- in diesem 45-minütigen Zeitfenster integrierte Vorbehandlung der Zellen (30 Minuten) mit den unterschiedlichen Wirkstoffen abgeschlossen war, wurde die Messung der Zellen gestartet. Dazu wurde die Durchflusskammer an das Pumpensystem angeschlossen und ein geeigneter Bildausschnitt im Durchlicht ausgewählt. Anschließend wurde die Pumpe gestartet, sodass die Zellen zunächst mit der jeweiligen Ringerlösung überspült wurden. Durch das Einschalten des Durchflusses kann es durch die mechanische Stimulation der Zellen zu einem Ablösen von einigen wenigen Zellen kommen, welche nicht vollständig auf der Oberfläche des Deckglases angewachsen oder angehaftet sind. Um Störungen der Messung durch diese abschwimmenden Zellen zu vermeiden, wurde vor Beginn der Messung jeweils 5-10 Sekunden gewartet, bis die nicht haftenden Zellen abgespült wurden. Anschließend wurde eine Durchlichtaufnahme (Belichtungszeit 200 ms, 400-fache Vergrößerung) des gewählten Bildausschnittes aufgenommen. Dann wurde das Durchlicht ausgeschaltet, und das Fluoreszenzlicht (Exzitation: 490 nm, Emission: 520 nm) eingeschaltet. Die Fluoreszenzmessung im Durchfluss-Messsystem besteht aus einer Videosequenz aus 130 im Abstand von 2 Sekunden aufgenommenen Einzelbildern (Belichtungszeit 200 ms, 400-fache Vergrößerung, Binning 2x2) und besitzt somit eine Gesamtdauer von 260 Sekunden. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch den Knopfdruck des elektronischen Schaltelements, was zur Schließung des Zulaufes der Spüllösung und zur Öffnung des Zulaufes der Stimulationslösung führt. Die Zellen wurden in allen durchgeführten Experimenten jeweils für 4 Sekunden mit den verwendeten Agonisten stimuliert. Aufgrund des technischen Aufbaus des Systems erreicht die zugeschaltete Stimulationslösung nach 10 Sekunden die Durchflusskammer, sodass jeweils eine entsprechende Verzögerung zwischen dem Zeitpunkt des Knopfdruckes und dem Eintritt der Flüssigkeit in die Kammer auftritt.

### **3.2.2.7 Auswertung der Rohdaten mit *ImageJ***

Die Videosequenz aus den während der Messung aufgenommenen Einzelbildern wurde mit Hilfe der Software „ImageJ“ ausgewertet. Die Stimulation der Zellen mit cholinergen Neurotransmittern oder

Agonisten führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und darüber zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität der Zellen, welcher durch die Auswertung quantifiziert werden soll.

Um die Änderung der Fluoreszenzintensität der Zellen bestimmen zu können, müssen die Zellen als ROI's (*region of interest*) in ImageJ markiert werden. Von diesen ROI's ermittelt ImageJ dann den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität als mittlerer Grauwert (mean grey value). Die Markierung der Zellen als ROI's wurde automatisiert mit Hilfe des ImageJ-PlugIns „GDSC“ der Universität Sussex durchgeführt ([http://www.sussex.ac.uk/gdsc/intranet/microscopy/UserSupport/AnalysisProtocol/imagej/gdsc\\_plugins/](http://www.sussex.ac.uk/gdsc/intranet/microscopy/UserSupport/AnalysisProtocol/imagej/gdsc_plugins/); zuletzt aufgerufen 13.03.2021). Dazu wurde zunächst ein Bild aus der Bildsequenz dupliziert und mit Hilfe eines Unschärfefilters (Gaussian Blur, Radius 2) modifiziert. Anschließend wurde das GDSC-PlugIn mit der „Find Foci“ Funktion angewendet. Die PlugIn-Funktion „Find Foci“ erkennt vollautomatisch die lokalen Maxima der Grauwert-Intensitäten im Bildausschnitt und gibt diese als X- und Y-Koordinaten der genauen Position im Bild aus. Durch verschiedene Voreinstellungen des Programms war es möglich, die Erkennung der lokalen Grauwert-Maxima so einzustellen, dass die lokalen Maxima mit einer sehr hohen Zuverlässigkeit das hellste Pixel einer jeden Zelle darstellen (Abbildung 13, A). Über ein selbsterstelltes Makro (Anhang, Abbildung A-16) konnten die Koordinaten der lokalen Maxima aus der Ergebnistabelle des PlugIns erfasst und als Mittelpunkt eines kreisrunden ROI's mit einem Durchmesser von 12 Pixel festgelegt werden (Abbildung 13, B). So wurde also der hellste Pixel jeder Zelle erkannt um den ein ROI mit definiertem Durchmesser gelegt wurde. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle ROI's die gleiche Größe besitzen, sodass sich die Berechnung des mittleren Grauwertes des ROI durch ImageJ immer aus der gleichen Anzahl an Pixeln zusammensetzt. Von jedem ROI wurde dann der mittlere Grauwert (mean grey value) zu jedem Zeitpunkt der Messung ausgegeben. Diese Daten konnten zur Auswertung dann in Excel übertragen werden.



**Abbildung 13:** Bildausschnitt mit den markierten lokalen Maxima nach Anwendung der FindFoci-Funktion (A) und nach Anwendung des ROI-Makros (B)

### 3.2.3 qRT-PCR

#### 3.2.3.1 RNA-Isolation

Zur Vorbereitung der qRT-PCR wurden einen Tag vorher 500.000 Zellen/Well in einer 6-Well Platte ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 300 µl Trizol ersetzt. Die Zellen wurden darin eine Minute inkubiert und dann mit einem Zellschaber von der Wachstumsfläche abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in 500 µl Reaktionsgefäße, in die 13 Keramikkügelchen vorgelegt waren, überführt. Danach erfolgte der mechanische Zellaufschluss, indem die Reaktionsgefäße mit der Zellsuspension für 4 Minuten gevortext wurden. Die Proben wurden danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 60 µl Chloroform zugegeben und die Proben für 15 Sekunden gevortext. Nachdem die Proben für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, wurden sie bei 4°C für 15 Minuten mit 12.000\*g zentrifugiert. Danach wurde die obere, durchsichtige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurden 150 µl Isopropanol und 1 µl Glycogen zugegeben bevor die Proben über Nacht bei -70°C ausfallen gelassen wurden. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4 °C für 10 Minuten mit 12.000\*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal in 75% Ethanol gewaschen (7 Minuten, 4°C, 7600\*g). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet an der Raumluft vollständig getrocknet. Danach wurden das Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und 5 Minuten bei 65°C im Wärmeblock erhitzt. Am Nanodrop konnte dann die RNA-Konzentration gemessen werden, die Proben können bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden.

#### 3.2.3.2 cDNA Synthese

Aus der isolierten RNA wird im nächsten Schritt cDNA synthetisiert. Dazu werden 2 µg RNA eingesetzt, zu denen 1 µl 10 µM OligoDT-Primer zugegeben werden. Die Mischung wird auf ein Gesamtvolumen von 12 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C erhitzt. Anschließend werden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl Revert-Aid Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben, sodass der Ansatz ein Gesamtvolumen von 20 µl aufweist. Der Ansatz wird für eine Stunde auf 42°C erhitzt und danach noch für 5 Minuten auf 70°C. Die synthetisierte cDNA kann dann bei -70°C gelagert werden.

#### 3.2.3.3 Durchführung der qRT-PCR

Der letzte Schritt des qRT-Assays besteht dann in der Durchführung der mRNA-Quantifizierung. Dazu werden die cDNA-Proben zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. In eine 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte werden dann 6,2 µl DEPC-H<sub>2</sub>O vorgelegt zu denen jeweils 0,4 µl des forward- und reverse Primers (10 µM) und 2 µl SYBR Green zugegeben werden. Anschließend wird 1 µl der cDNA-

Probe zugegeben und die Proben nach dem folgenden Protokoll im qRT-Cycler vervielfältigt (Abbildung 14):

x39	1	95°C	15 Min
	2	95° C	15 Sek
	3	60°C	20 Sek
	4	72°C	20 Sek
	5	95 °C	15 Sek
	7	Schmelzkurve 60 – 95°C (+0,5 °C Schritte)	5 Sek

Abbildung 14: qRT-Zyklus-Protokoll

### 3.2.4 ELISA-Assay

Für diese Versuche wurden SHSY-5Y-Zellen in einer 96-Well Zellkulturplatte mit einer Dichte von 50.000 Zellen/Well ausgesät und über Nacht angewachsen gelassen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen entfernt und durch die entsprechende Behandlung in Ringerlösung (37°C) ersetzt. Nach der Behandlung wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit Ringerlösung (37°C) gewaschen. Danach wurden 100 µl/Well eiskaltes 96% EtOH zur Vorfixierung zu den Zellen gegeben. Dieses wurde nach 5 Minuten wieder entfernt und durch 50 µl 4% Formalin ersetzt. Die Zellen wurden so für 15 Minuten fixiert. Das Formalin wurde danach durch zweimaliges waschen mit PBST vollständig entfernt und durch 100 µl heißen Citratpuffer (95°C) ersetzt. Dieser wurde im Wärmeschrank für 15 Minuten bei 90°C zur Demaskierung auf den Zellen inkubiert. Nach kurzem abkühlen wurde der Citratpuffer abgenommen und es wurde einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten mit 300 µl Blockpuffer, 0.5% BSA geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µl des primären Antikörpers (1:1000) für eine Stunde. Nach dieser Stunde wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen bevor der sekundäre Antikörper (1:4000, 50 µl) ebenfalls für eine Stunde inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligen waschen mit PBS wurden dann 200 µl NPP-Lösung (7 mg NPP/20 ml RxN Puffer) zugegeben. Die Platte wurde bis zur ausreichenden Färbung (1-24h) im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Bei der Auswertung wurden jeweils 4 Wells der gleichen Behandlung zu einer Probe zusammengefasst, die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines T-Tests (zweiseitig, unabhängig, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ )

### **3.2.5 Puromycin-Assay**

#### **3.2.5.1 Vorbehandlung der Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Translationsaktivität der SHSY-5Y Zellen mit und ohne Einfluss von Translationsinhibitoren quantifiziert werden, um die Eignung dieser Inhibitoren nachzuweisen. Daher wurden die Zellen zunächst mit verschiedenen Translationsinhibitoren für 30 Minuten vorbehandelt. Die Zellen wurden einen Tag vor Durchführung des Assays mit einer Zelldichte von 500.000 Zellen/Well in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Zu Beginn des Assays wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml der Behandlungslösung mit verschiedenen Translationsinhibitoren ersetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit den Inhibitoren vorbehandelt. Anschließend wurde die Behandlungslösung abgenommen und durch 500 µl der Puromycin-Lösung (10 µg/ml, Schmidt et al. 2006) ersetzt. Nachdem die Zellen für 10 Minuten mit Puromycin inkubiert wurden, wurden die Puromycin-Lösung abgenommen und die Zellen zweimal mit 3 ml Humanringer gewaschen um alle Puromycin-Reste zu entfernen. Anschließend wurden 500 µl DotBlot-Homogenisierungspuffer zu den Zellen gegeben. Darin wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Wachstumsfläche der 6-Well Platte abgekratzt, in ein 1 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 Minuten 1100\*g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 300 µl DotBlot-Homogenisierungspuffer resuspendiert und die Zellsuspension in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt, in dem 13 Keramikkügelchen vorgelegt waren. Danach erfolgte der mechanische Zellaufschluss indem die Reaktionsgefäße mit der Zellsuspension für 3 Minuten gevortext wurden.

#### **3.2.5.2 Puromycin-Nachweis per Dot-Blot**

Vor der Durchführung des Dot-Blots wurde die Apparatur, wie in der Betriebsanleitung beschrieben, zusammengesetzt. Die Apparatur besteht aus einem unteren und einem oberen Deckel, zwischen die ein Whatman-Filterpapier und die Nitrozellulosemembran geklemmt werden. Durch die Löcher in den Deckeln wird die Probe auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen und per Unterdruck in die Membran eingesaugt. Bevor die Membran und das Filterpapier in die Apparatur eingelegt werden, werden sie zunächst mit Blotpuffer befeuchtet. Vor dem Auftrag der Proben wird die Membran einmal mit Blotpuffer gespült und 5 Minuten trockensaugen gelassen. Anschließend werden die Proben in einer Verdünnungsreihe (100%, 33%, 11%, 3,6%) aufgetragen, in die Membran einsaugen gelassen und 5 Minuten trockensaugen gelassen. Anschließend wird nochmals mit Blotpuffer gespült. Die Membran kann dann aus der Apparatur entfernt werden. Danach wird die Membran mit 2% BSA geblockt und anschließend jeweils für eine Stunde mit dem primären (anti-Puromycin, 1:10000) und sekundären Antikörper (anti-Maus alkalische Phosphatase, 1: 4000) inkubiert. Zur Färbung der Membran wurde eine BCIP-Färbung durchgeführt. Dazu wurde 0,1% NBT (Nitroblue-Tetrazolium) in RxN Puffer gelöst und 4% BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) in 150 µl DMSO. Beide Lösungen wurden

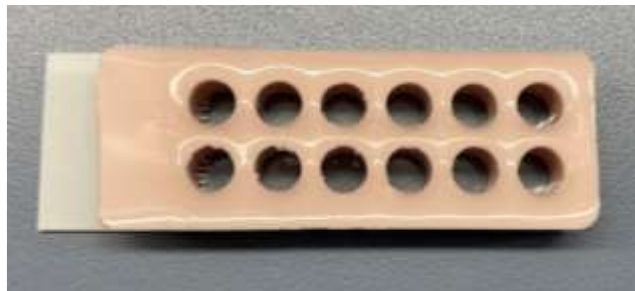


gemischt und die Nitrozellulosemembran darin bis zur Entwicklung einer gut sichtbaren Blau-Färbung im Dunkeln gefärbt. Wenn die Färbung erreicht war, wurde sie abgestoppt, in dem die Membran zweimal mit normalem Wasser gewaschen wurde. Sobald die Membran getrocknet ist, kann sie zur Dokumentation fotografiert werden. Von jeder Verdünnungsreihe wurde in Excel die Steigung der Färbungsintensität berechnet, welche dann als gemeinsamer Mittelwert pro Behandlungsgruppe dargestellt wurde.

### 3.2.6 Histologische Färbungen

#### 3.2.6.1 Durchführung der histologischen Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Durchführung der histologischen Färbungen wurden die SHSY-5Y Zellen auf Mikroskopie-Objektträger ausgesät. Dazu wurden auf den Objektträgern 12-Well-Silikonkammern aufgebracht, in deren Vertiefungen die Zellen ausgesät wurden (Abbildung 15).



**Abbildung 15: 12-Well-Silikonkammer auf einem Objektträger**

Vor der Verwendung der Objektträger und der Silikonkammern wurden diese mit 70% Ethanol gereinigt und zur vollständigen Verdunstung des Ethanols mindestens eine Stunde trocknen gelassen. Pro Vertiefung wurden einen Tag vor Durchführung der Experimente 30.000-40.000 Zellen in MEM/F12-Medium ausgesät und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> auswachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde zunächst vor Durchführung des Experimentes die Morphologie und Wachstumsdichte der Zellen kontrolliert. Anschließend wurde das Medium vollständig abgenommen und jeweils durch 100 µl Behandlungslösung ersetzt, welche für 30 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C auf den Zellen inkubiert wurde. Die Behandlung wurde so durchgeführt, dass jeweils eine Hälfte des Objektträgers mit der Kontrolllösung, und die andere Hälfte mit der jeweiligen Behandlungslösung inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Behandlungslösung abgenommen und zur Fixierung der Zellen durch 100 µl PFA ersetzt. Nach 5 Minuten wurde die PFA-Lösung erneut abgenommen und die Silikonkammer konnte vorsichtig vom Objektträger abgezogen werden. Nach der Fixierung wurden die Objektträger mit den Zellen dann in heißen Natrium-Citratpuffer (90-95°C) für 10 Minuten demaskiert und im Anschluss daran 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Sobald die Objektträger abgekühlt waren, wurden sie einmal mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 500 µl Blockpuffer (5 %) für 30 Minuten inkubiert. Nachdem die Blocklösung erneut abgenommen

wurde, wurden die Zellen zunächst für 90 Minuten mit dem primären Antikörper (pSirt-1, 1:100, 500  $\mu$ l) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper von den Zellen abgenommen und die Objektträger dreimal für jeweils zwei Minuten mit 500  $\mu$ l Hochsalz-PBST gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lichtgeschützt für 30 Minuten mit dem sekundären, Cy3-gekoppelten Antikörper (Cy3-anti Rabbit, 1:1000, 500  $\mu$ l) inkubiert. Nachdem der sekundäre Antikörper erneut von den Zellen abgenommen und verworfen wurde, wurden die Objektträger zweimal für je zwei Minuten mit 500  $\mu$ l Hochsalz-PBST gewaschen. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Zellen anschließend für weitere zwei Minuten mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit für zwei Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Fertigstellung der Färbung wurden die Objektträger mit Hilfe von 20-30  $\mu$ l einer wässrigen Glycerinlösung (Glycerin/H<sub>2</sub>O 1:1) eingedeckt und über Nacht trocknen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Aufnahme der histologischen Färbung am Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI8). Von jeder Vertiefung wurden zwei Aufnahmen an unterschiedlichen Stellen gemacht, davon jeweils eine für den Cy3-Kanal und eine für den DAPI-Kanal. Die Auswertung der histologischen Färbung erfolgte anschließend mit Hilfe von ImageJ.

### 3.2.6.2 Auswertung der Fluoreszenzbilder mit ImageJ

Bei der Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen der histologischen Färbung war es aufgrund der DAPI-Doppelfärbung möglich das Cytoplasma und die Zellkerne der Zellen getrennt voneinander auszuwerten. Vor der Auswertung muss dabei zunächst sichergestellt werden, dass in den Messeinstellungen von ImageJ („*set measurement*“) die Funktionen „*mean grey value*“ und „*Limit to threshold*“ aktiv sind.

In einem ersten Schritt wurden in den Cy3-Aufnahmen alle Bereiche mit Zellen (Cytoplasma-ROI's, Abbildung 16, A) und in den DAPI-Aufnahmen alle Bereiche mit gefärbten Zellkernen (Zellkern-ROI's, Abbildung 16, B) mit Hilfe eines selbstgestalteten ImageJ Makro (s. Anhang, Abbildung A-17) als ROI's markiert.

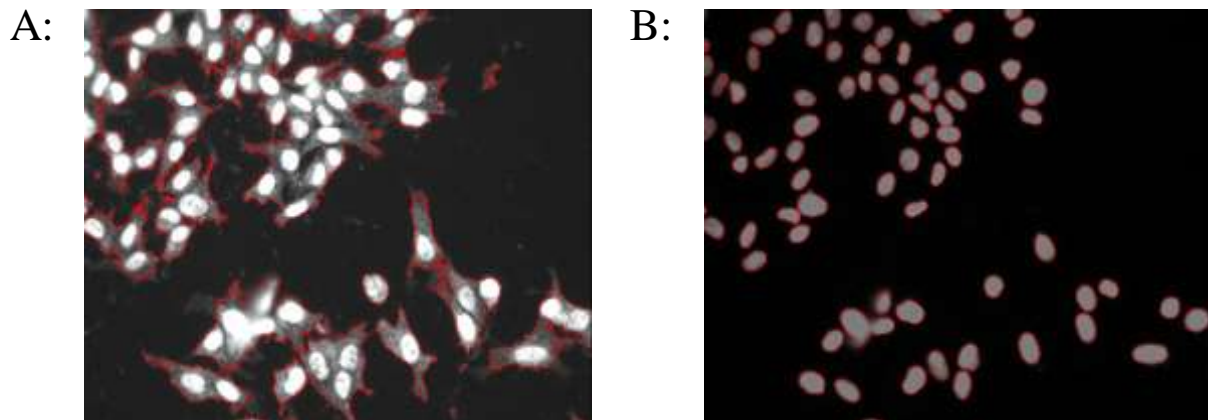
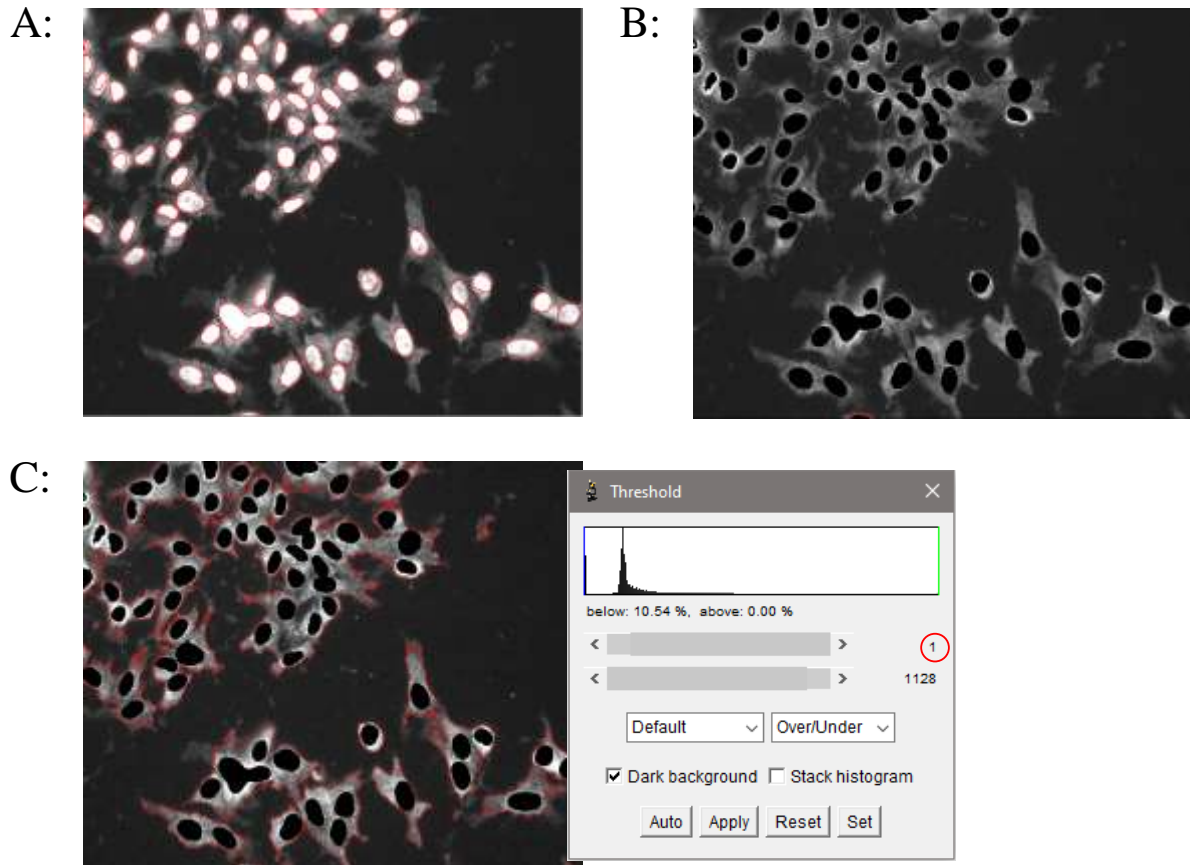


Abbildung 16: Bildausschnitt mit den markierten Cytoplasma ROI's (A) und den markierten Zellkern ROI's (B)

Zur Auswertung der Zellkern-Bereiche werden dann zunächst die Zellkern-ROI's auf der Cy3-Aufnahme dargestellt. Über die Funktion „measure“ im ROI-Manager wird dann der mittlere Grauwert („mean grey value“) der einzelnen Zellkern-Bereiche berechnet (Abbildung 17, A).

Um die Cytoplasma-Bereiche der Zellen auswerten zu können, wurden zunächst die Zellkern-Bereiche aus den Aufnahmen gelöscht. Auch dazu wurden die Zellkern-ROI's auf der Cy3-Aufnahme dargestellt (Abbildung 17, A). Mit einem selbstgestalteten ImageJ Makro (s. Anhang, Abbildung A-18) wurden dann alle Zellkern-ROI's aus der Aufnahme entfernt (Abbildung 17, B). Anschließend wurden die Zellkern-ROI's wieder aus dem ROI-Manager entfernt und die Cytoplasma-ROI's geladen (Abbildung 17, C). Nun wurde der Treshold-Manager aufgerufen und die untere Grenze des Tresholds auf 1 gesetzt, allerdings ohne es über „*apply*“ anzuwenden. Über die Funktion „measure“ im ROI-Manager wird dann der mittlere Grauwert („mean grey value“) der Cytoplasma-Bereiche berechnet, allerdings ohne dass die schwarzen Bereiche der entfernten Zellkerne berücksichtigt werden. Die gelöschten Bereiche besitzen in den verwendeten 16-bit .tiff Dateien den Wert 0. Da die Funktion „Limit to treshold“ aktiv ist und der Treshold vor der Messung auf 1 gesetzt wurde, fließen diese Nullwerte nicht in die Berechnung des Mittelwertes ein.



**Abbildung 17:** Markierung der Zellkerne (A), entfernen der Zellkerne (B) und Markierung des Cytoplasmas ohne Einbezug der Zellkerne (Threshold-Minimum = 1)

Auf diese Weise erhält man von jeder Aufnahme sowohl den mittleren Grauwert der Cytoplasma-Bereiche, als auch den mittleren Grauwert der Zellkern-Bereiche. Da sehr nah beieinanderliegende Zellen als gemeinsame Zellfläche ausgewertet werden, wird keine Auswertung in Bezug auf die Zellzahl durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde von jeder Vertiefung jeweils der Mittelwert aller mittleren Grauwerte der Cytoplasma-Bereiche und der Mittelwert aller Zellkern-Bereiche berechnet. Dann wurde von diesen Mittelwerten noch die Färbung des Hintergrunds ohne Zellen abgezogen. Dazu wurden in jeder Aufnahme fünf zellfreie Bereiche als ROI markiert (120x120 Pixel) und der Mittelwert dieser Hintergrund-ROI's jeweils von den Mittelwerten der Zellfläche- und Zellkern-ROIS subtrahiert. Anschließend wurde der Quotient (Grauwert Zellkern / Grauwert Cytoplasma = Ratio Zellkern/Cytoplasma) berechnet. Die durch die Vorbehandlung der Zellen auftretenden Unterschiede der Ratio-Werte wurden dann mit Hilfe eines T-Tests (zweiseitig, ungepaart, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) auf ihre statistische Signifikanz überprüft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Verwendung der SHSY-5Y Zelllinie zur Analyse Acetylcholin-induzierter Calciumsignale

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SHSY-5Y Zelllinie dazu verwendet, die Wirkung von Topiramaten (TPM) auf Acetylcholin (ACh)-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA zu untersuchen und zu charakterisieren. Vor der Verwendung dieser humanen Neuroblastomzelllinie muss zunächst sichergestellt werden, dass sich diese Zellen eignen, um die vorliegende Fragestellung mit Hilfe von Calcium-Imaging-Experimenten zu untersuchen. Eine Voraussetzung ist dabei das Vorliegen eines funktionellen cholinergen Systems, sodass die Zellen über die Applikation von Neurotransmittern und Agonisten des cholinergen Systems stimuliert werden können und messbare Stimulations-induzierte Calciumsignale nachweisbar sind.

#### 4.1.1 Die mRNA-Expression nikotinischer Acetylcholinrezeptoren stimmt mit den Daten aus der Literatur überein

Eine Voraussetzung zum Vorliegen eines funktionellen cholinergen Systems ist die Expression von cholinergen Neurotransmitterrezeptoren. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass SHSY-5Y Zellen mRNA's verschiedener Untereinheiten neuronaler Acetylcholinrezeptoren exprimieren (Korecka et al. 2013). Da es sich bei dieser humanen Neuroblastomzelllinie allerdings um eine immortalisierte Krebszelllinie handelt, besteht immer die Möglichkeit von Spontanmutationen und physiologischen Veränderungen über verschiedenen Chargen der Zellkultur. Um auszuschließen, dass sich die hier verwendeten SHSY-5Y Zellen hinsichtlich ihrer mRNA-Expression von den vorliegenden Daten aus der Literatur unterscheiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die mRNA-Expression einiger Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten der verwendeten SHSY-5Y Zellen analysiert und mit den Literaturwerten abgeglichen. Dabei wurde exemplarisch die mRNA-Expression verschiedener Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR) untersucht (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Relativer mRNA-Gehalt verschiedener nAChR-Untereinheiten als mittlere Zyklusanzahl  $\pm$  Standardabweichung der qRT-PCR (n=5)**

Untereinheiten	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 7$	$\beta 2$	$\beta 4$
mittlere Zellzykluszahl	26,45	-	28,47	28,05	30,48	29,02
Standardabweichung	1,91	-	1,14	2,08	2,82	2,20

Es konnte gezeigt werden, dass, bis auf die  $\alpha 4$ -Untereinheit, die mRNA-Expression aller exemplarisch untersuchten Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren in den verwendeten SHSY-5Y Zellen nachweisbar ist. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Expressionsanalysen an SHSY-5Y überein, bei

denen ebenfalls eine fehlende mRNA-Expression der  $\alpha 4$ -Untereinheit nachgewiesen werden konnte (Korecka et al. 2013). Da sich die hier analysierte mRNA-Expression der nikotinischen Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten nicht wesentlich von der in der Literatur beschriebenen mRNA-Expression in SHSY-5Y Zellen unterscheidet, liegen keine Hinweise auf eine mutationsbedingte Veränderung der mRNA-Expression in Bezug auf das cholinerge System der verwendeten SHSY-5Y vor.

#### **4.1.2 TPM beeinflusst ACh-induzierte Calciumsignale in differenzierten und undifferenzierten SHSY-5Y Zellen**

Neben der Expression cholinergischer Transmitterrezeptoren konnten verschiedene Arbeiten auch zeigen, dass SHSY-5Y Zellen durch die Zugabe von Acetylcholin und Nikotin depolarisierbar sind und ein messbares intrazelluläres Calciumsignal nach Stimulation des cholinergen Systems an diesen Zellen nachweisbar ist (Gould et al. 1992, Ridley et al. 2002). Um zu überprüfen, ob die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SHSY-5Y Zellen ebenfalls über die Applikation von Acetylcholin stimulierbar sind, wurden ACh-induzierte Calciumsignale dieser Zellen mit Hilfe von Calcium-Imaging Experimenten analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 beladen und anschließend die Änderung des Fluoreszenzsignals in Folge einer einmaligen Stimulation der Zellen mit ACh analysiert.

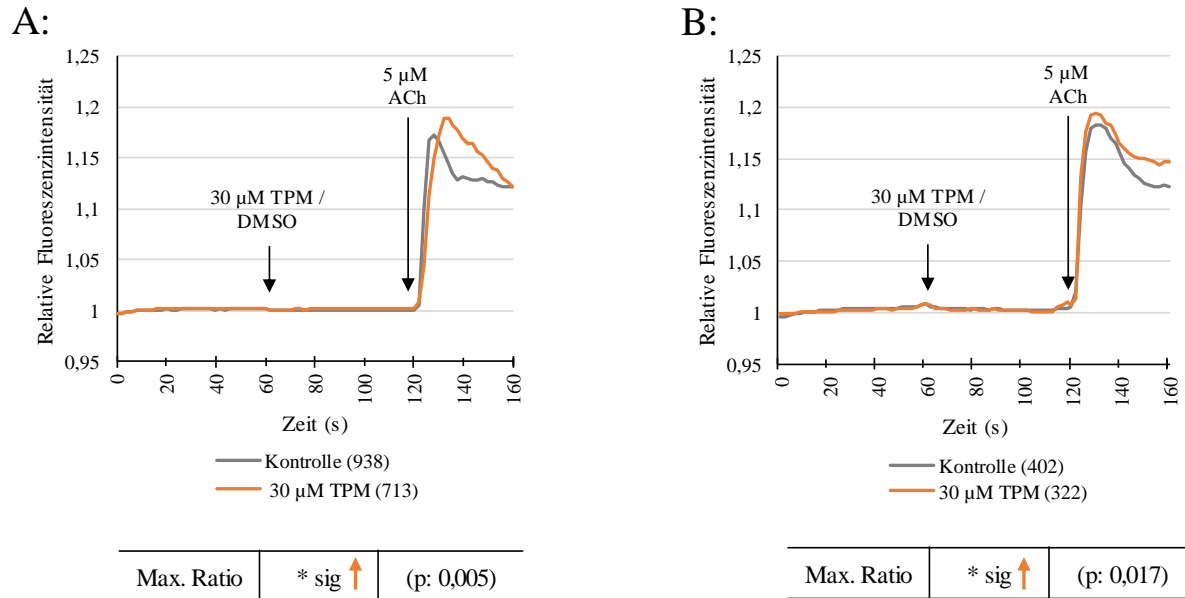
Neben der Untersuchung, ob die verwendeten Zellen mit ACh stimulierbar sind, wurden im Rahmen dieses Versuches zudem zwei weitere Fragestellungen untersucht. Zum einen wurde ermittelt, ob TPM einen Einfluss auf diese ACh-induzierte Calciumsignale an SHSY-5Y Zellen besitzt, indem die ACh-induzierten Calciumsignale unter Einfluss von 30  $\mu\text{M}$  TPM analysiert wurden. Eine Minute nach Beginn der Messung wurde 30  $\mu\text{M}$  TPM (Kontrolllösung: 0,06% DMSO) zu den Zellen hinzugegeben, bevor die Zellen eine weitere Minute später über die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  ACh stimuliert wurden (Abbildung 18). Die TPM-Konzentration orientiert sich an den physiologischen Werten, die im Gehirn von Maus und Mensch nach Verabreichung von TPM vorliegen (Shank et al. 2000).

Zum anderen wurde ermittelt, ob für die Versuchsdurchführungen im Rahmen dieser Arbeit eine Ausdifferenzierung der Zellen notwendig ist. Die Messungen wurden deshalb sowohl an standardmäßig kultivierten, undifferenzierten SHSY-5Y Zellen, als auch an differenzierten SHSY-5Y Zellen durchgeführt. In der Literatur wird die verwendete SHSY-5Y Zelllinie als Mischkultur aus morphologisch unterscheidbaren Zell-Phänotypen, Neuroblasten-ähnlichen und Epithel-ähnlichen Zellen, beschrieben (Kovalevich und Langford 2013). Deshalb ist es möglich, die SHSY-5Y Zellen, vor einer Verwendung zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen, mit Hilfe von Retinsäure zu einem reiferen Neuron-ähnlichen Phänotyp ausdifferenzieren (Kovalevich und Langford 2013, verwendetes Protokoll s. Material und Methoden, Kapitel 3.2.1.1). Um zu ermitteln, ob eine solche

Ausdifferenzierung der SHSY-5Y Zellen auch zur Durchführung der hier verwendeten Calcium-Imaging-Experimente notwendig ist, wurden jeweils die ACh-induzierten Calciumsignale undifferenzierter und ausdifferenzierter SHSY-5Y Zellen unter Einfluss von 30  $\mu$ M TPM gemessen und mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen (Abbildung 18).

Dargestellt ist jeweils der gemeinsame zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten der Zellen einer Behandlungsgruppe als Median der zeitlichen Verläufe aller Zellen dieser Gruppe. Die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle zu einem gemessenen Zeitpunkt berechnet sich aus der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Zeitpunktes, normiert auf die Grundfluoreszenz der Zelle (Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten 0-20 Sekunden).

Um die Wirkung von 30  $\mu$ M TPM auf die ACh-induzierten Calciumsignale zu ermitteln, wurde die Reaktionsstärke (max. Ratio) aller Zellen berechnet und mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangtests statistisch mit den gemessenen Reaktionsstärken der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Die Reaktionsstärke einer Zelle errechnet sich dabei aus dem Quotient der maximalen Fluoreszenzintensität nach der Stimulation geteilt durch die minimale Fluoreszenzintensität vor der Stimulation. Um stimulationsunabhängige Fluoreszenzschwankungen, die durch den technischen Aufbau hervorgerufen werden, auszuschließen, wurden nur Zellen ausgewertet, die zu Beginn der Messung (0-40 Sekunden) Fluoreszenzschwankungen kleiner 2% aufgewiesen haben. Die Fluoreszenzschwankung wurde als Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert) des Bereiches zu Beginn der Messung errechnet. Dadurch wurden im Durchschnitt aller durchgeführter Experimente 2,7% ( $\pm 2,6$ ) aller Zellen von der Auswertung ausgeschlossen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind unter den zeitlichen Verläufen der Fluoreszenzintensitäten dargestellt.



**Abbildung 18: 30  $\mu\text{M}$  TPM verstärkt den ACh-induzierten Calciumeinstrom an undifferenzierten (A) und differenzierten Zellen (B) nach einmaliger Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh**

**A:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der undifferenzierten Neurone nach Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh. Dargestellt ist der Median der zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensität aller ausgewerteten Zellen der entsprechenden Vorbehandlung, Zellzahlen in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente jeweils  $n = 10$ . Zugabe von TPM nach 60 Sekunden, Zugabe von ACh nach 120 Sekunden (Pfeile). Statistische Auswertung der max. Ratio mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig.“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang

**B:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der differenzierten Neurone nach Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh. Dargestellt ist der Median der zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzintensität aller ausgewerteten Zellen der entsprechenden Vorbehandlung, Zellzahlen in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle  $n = 4$ , TPM  $n = 5$ . Zugabe von TPM nach 60 Sekunden, Zugabe von ACh nach 120 Sekunden (Pfeile). Statistische Auswertung der max. Ratio mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig.“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es ist zu erkennen, dass sowohl an undifferenzierten, als auch an ausdifferenzierten SHSY-5Y Zellen ein ACh-induziertes Calciumsignal nachweisbar ist. Zudem führt die Vorbehandlung der Zellen beider Gruppen mit 30  $\mu\text{M}$  TPM zu einer signifikanten Verstärkung dieses ACh-induzierten Calciumsignals, wodurch gezeigt werden konnte, dass TPM ACh-induzierte Calciumsignale an SHSY-5Y Zellen beeinflusst. Da die Ausdifferenzierung der Zellen im Vorfeld des Versuches weder die Ausbildung ACh-induzierter Calciumsignale, noch die Wirkung von TPM auf diese verändert, ist eine Ausdifferenzierung der verwendeten SHSY-5Y Zellen zur Vorbereitung der folgenden Calcium-Imaging Experimente nicht notwendig.



## 4.2 Etablierung eines Messsystems zur Analyse von ACh-induzierten Calciumsignalen unter Berücksichtigung aktivitätsabhängiger Adaptionen

Nachdem im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, dass TPM einen Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale an den verwendeten SHSY-5Y Zellen besitzt, soll diese Wirkung nun im Folgenden genauer charakterisiert werden.

Um die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale umfassend zu analysieren, ist es wichtig, zu berücksichtigen, dass nicht nur der Wirkstoff die Ausbildung von ACh-induzierten Calciumsignalen beeinflusst, sondern dass auch die Physiologie der untersuchten Neurone selbst einen Einfluss auf die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzen kann. Es ist bekannt, dass Neurone hochdynamischen physiologischen Veränderungen in Abhängigkeit ihrer Aktivität unterliegen (Davis 2006, Turrigiano 2011). Diese intrinsischen aktivitätsabhängigen Adaptionen der Neurone stehen in Wechselwirkung mit der externen Beeinflussung durch einen Wirkstoff wie TPM, wodurch sich beide Faktoren gegenseitig beeinflussen können.

Um neben der Beeinflussung des ACh-induzierten Calciumeinstroms durch TPM auch den Aspekt aktivitätsabhängiger intrinsischer Adaptionen der untersuchten Neurone berücksichtigen zu können, wurde ein Messsystem etabliert, welches durch die Messung der Zellen im Durchfluss und den schnellen Austausch der Stimulationslösung eine multiple Stimulation der untersuchten Neurone ermöglicht. Das im Rahmen dieser Arbeit angewendete Stimulationsprotokoll bestand dabei aus sechs aufeinanderfolgenden Stimulationen, wobei fünf Stimulationen direkt nacheinander im Abstand von 30 Sekunden appliziert wurden. Die sechste Stimulation erfolgt im Abstand von einer Minute zur vorangegangenen Stimulationssequenz (Abbildung 19).

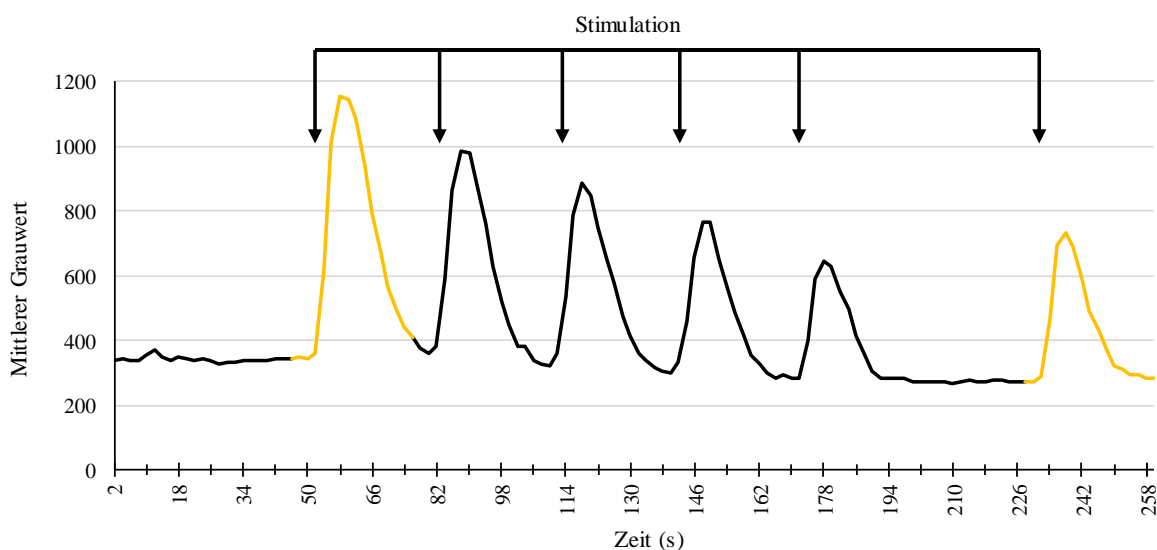


Abbildung 19: Beispielverlauf der Fluoreszenzintensität (mittlerer Grauwert) einer Zelle während der multiplen Stimulation

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, führt die multiple Stimulation der Neurone zu einer zunehmenden Reduktion der stimulationsinduzierten Calciumsignale während der fünf aufeinanderfolgenden Stimulationen. Diese Reduktion ist stabil und auch bei der sechsten Stimulation, welche im Abstand von einer Minute zu den aufeinanderfolgenden Stimulationen appliziert wird, nachweisbar und spricht somit für das Eintreten aktivitätsabhängiger adaptiver Prozesse.

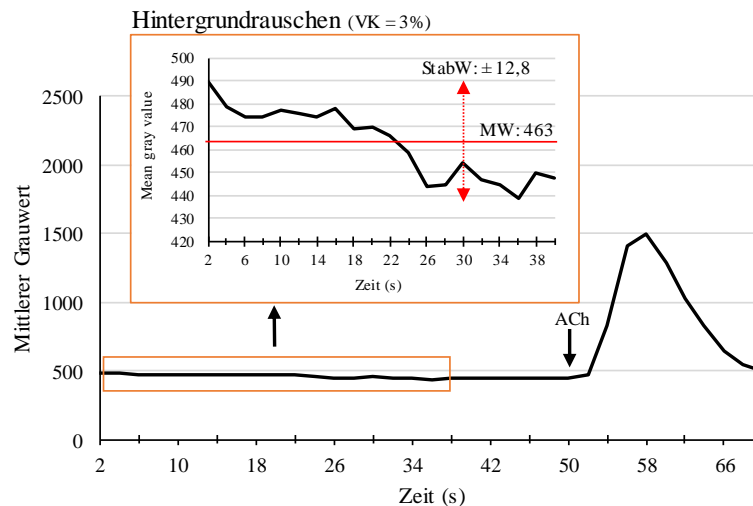
Um anhand dieses Stimulationsprotokolls alle verschiedenen Aspekte der Wirkung einer Behandlung umfassend zu analysieren, wurden sowohl die stimulationsinduzierten Calciumsignale der ersten Stimulation, als auch die Calciumsignale der letzten Stimulation ausgewertet (Abbildung 19, gelbe Markierung). Durch die Auswertung der ersten Stimulation kann dabei die Beeinflussung stimulationsinduzierter Calciumsignale ohne zusätzliche aktivitätsabhängige physiologische Adaptionen der Neurone untersucht werden. Die Auswertung der letzten Stimulation hingegen ermöglicht es, die Beeinflussung stimulationsinduzierter Calciumsignale im Zusammenspiel aus der Wirkung der untersuchten Behandlung und dem Einfluss aktivitätsabhängiger Adaptionen der Neurone zu untersuchen.

#### **4.2.1 Auswertung der $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei multipler Stimulation**

##### a) Definition des Signal/Rausch-Verhältnisses

Um die stimulationsinduzierten Calciumsignale zuverlässig analysieren zu können, muss zunächst ein Grenzwert etabliert werden, anhand dessen sich die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Folge der applizierten Stimulation (Signal) klar von stimulationsunabhängigen Hintergrundschwankungen der Fluoreszenzintensität (Rauschen) unterscheiden lässt.

Um stimulationsunabhängige Schwankungen der Fluoreszenzintensität (Rauschen) mathematisch erfassen zu können, wurde der Variationskoeffizient ( $\text{VK} = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$ ) der Zellen zu Beginn der Messung (0-40 Sekunden), also vor Applikation einer Stimulation, berechnet (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Berechnung des Variationskoeffizienten vor Zugabe der Stimulation**

Dargestellt ist der Bereich zu Beginn der Messung (0-40 Sekunden), in dem bei jeder gemessenen Zelle der Variationskoeffizient als Quotient aus Standardabweichung/Mittelwert berechnet wurde. Die Werte der Standardabweichung und des Mittelwertes sind beispielhaft für den Verlauf dieser Zelle dargestellt, der Variationskoeffizient dieser Zelle liegt bei 3%.

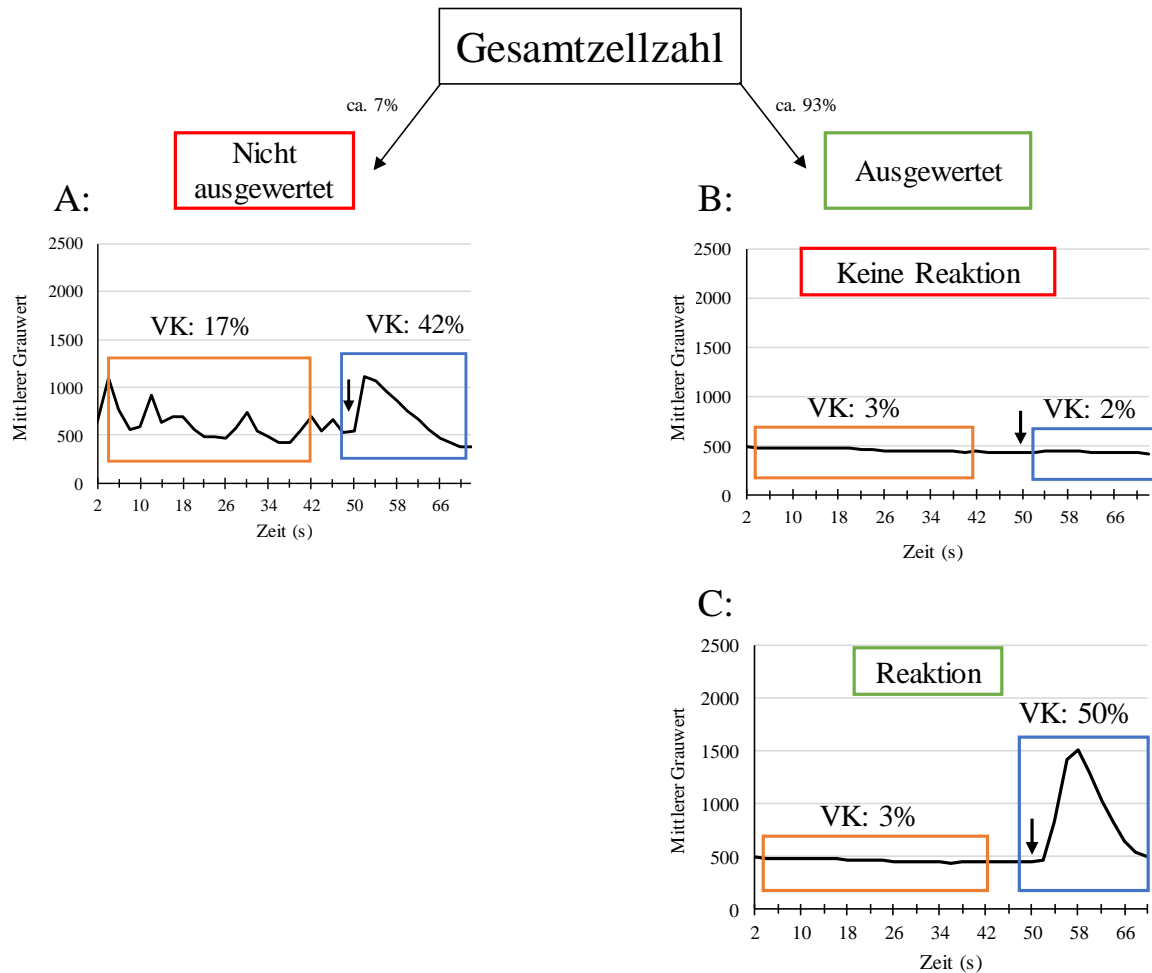
Dabei wurde ermittelt, dass der Variationskoeffizient zu Beginn der Messung im Durchschnitt aller durchgeführten Versuche bei einem Wert von 0,035 ( $\pm 0,009$ ) bzw. 3,5% ( $\pm 0,09\%$ ) liegt (n: 16 Versuche, gesamt 22.765 Zellen). Dies bedeutet, dass vor Zugabe einer Stimulation eine Schwankung des Fluoreszenzsignals um 3,5% vorliegt. Anhand dieses Wertes wurde festgelegt, dass die Änderung der Fluoreszenzintensität während einer Stimulation (50-80 Sekunden) mindestens doppelt so groß sein muss (7%), wie das ermittelte Hintergrundrauschen, damit sie als spezifische stimulationsbedingte Fluoreszenzänderung interpretiert werden kann.

#### b) Ermittlung reaktiver und nicht reaktiver Zellen

Anhand des berechneten 7% Grenzwertes wurden zunächst alle Zellen für eine weitere Auswertung ausgeschlossen, deren VK vor der Zugabe einer Stimulation größer als 7% ist und die somit bereits vor Zugabe der Stimulation starke Schwankungen der Fluoreszenz zeigen (Abbildung 21, A). Dies betrifft im Durchschnitt aller durchgeführten Versuche 6,8 % ( $\pm 5\%$ ) aller gemessenen Zellen (Gesamtzellzahl: 22.765 Zellen in 16 Versuchen).

Nur Zellen, deren berechneter VK vor Zugabe einer Stimulation weniger als 7% betrug, wurden im Folgenden weiter ausgewertet (Abbildung 21, B+C). Die ausgewerteten Zellen lassen sich dabei erneut in zwei Klassen unterteilen: Zellen, bei denen kein messbares Calciumsignal in Folge der Stimulation nachweisbar ist und die somit nicht auf die Stimulation reagieren (VK im Bereich der Stimulation  $< 7\%$ , Abbildung 21, B) und Zellen, die ein solches stimulationsbedingtes Calciumsignal zeigen (VK im Bereich der Stimulation  $> 7\%$ , Abbildung 21 C). Aufgrund unterschiedlicher Stimulationen und

Vorbehandlungen im Rahmen der Arbeit wird die genaue Anzahl an reagierenden und nicht-reagierenden Zellen und deren statistische Überprüfung per T-Test (zweiseitig, ungepaart, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) bei der Analyse der einzelnen Versuche jeweils nochmal einzeln aufgeführt.

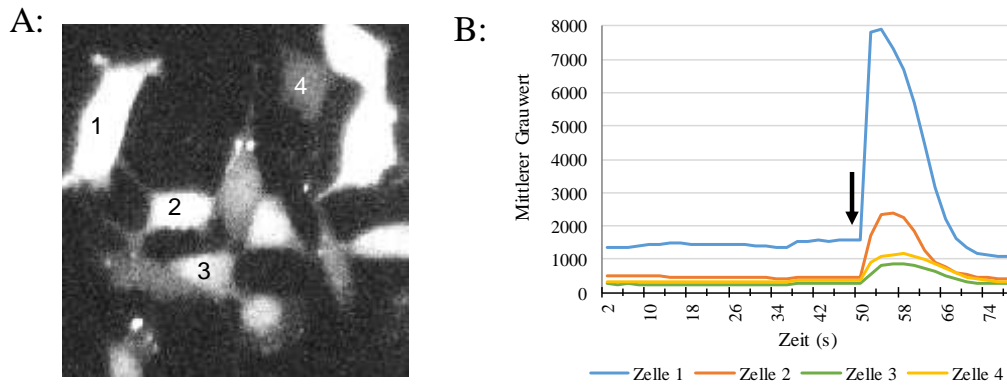


**Abbildung 21: Schematische Darstellungen der Einteilung der Zellen**

Dargestellt ist das Schema zur Einteilung der Zellen in Zellen, welche von der Auswertung ausgeschlossen wurden (ca. 7% aller jemals gemessenen Zellen, „nicht ausgewertet“, A) und Zellen, die im Folgenden in die Auswertung aufgenommen werden („ausgewertet“). Die Gruppe der ausgewerteten Zellen teilt sich nochmals auf in Zellen, die keine spezifische Reaktion auf die Stimulation zeigen („keine Reaktion“, B) und solche, die eine spezifische Reaktion zeigen („Reaktion“, C). Der Zeitpunkt der Stimulationszugabe ist per Pfeil markiert.

### c) Auswertung und Darstellung der stimulationsinduzierten Calciumsignale

Obwohl es sich bei den verwendeten Zellen um eine klonale Zelllinie handelt, unterscheiden sich die einzelnen ausgewerteten Zellen zum Teil deutlich im Verlauf ihrer Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 22, A+B). Dabei können selbst bei benachbarten Zellen der gleichen Messung sowohl klare Unterschiede in Bezug auf die Grundfluoreszenz, als auch in Bezug auf die maximale Fluoreszenzintensität in Folge der Stimulation vorliegen (vgl. Abbildung 22, B).

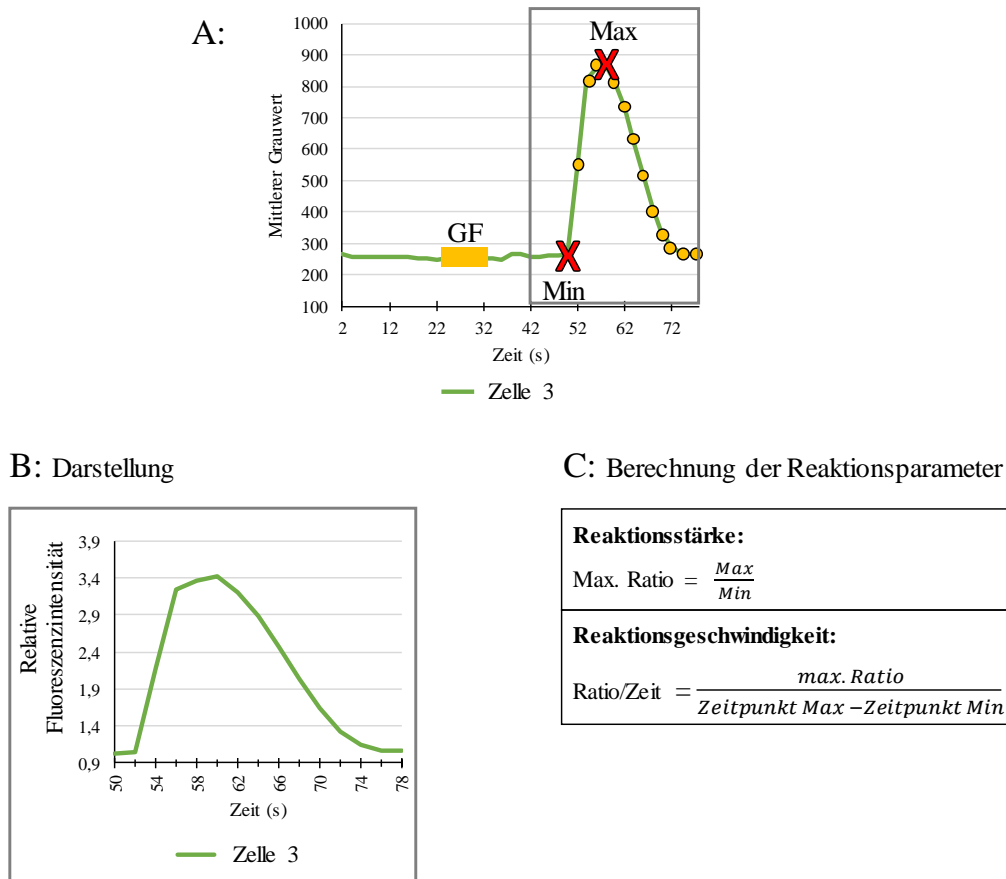


**Abbildung 22: Bildausschnitt gemessener Zellen (A) und der zeitliche Verlauf ihrer Fluoreszenzintensitäten (B), Zugabe der Stimulation mit Pfeil markiert**

Um die Änderungen der Fluoreszenzintensität trotz dieser Heterogenität gemeinsam darstellen und miteinander vergleichen zu können, wurden sowohl bei der graphischen Darstellung, als auch bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse nicht die absoluten Grauwerte, sondern die relativen Fluoreszenzintensitäten verwendet.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde dabei zunächst von jeder Zelle der zeitliche Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität dargestellt (Abbildung 23, A und B). Dazu wurden für jede Zelle die Fluoreszenzintensitäten zu den Zeitpunkten nach der Stimulation (Abbildung 23, A, gelbe Punkte) auf die Grundfluoreszenz vor der Stimulation normiert (Abbildung 23, A, „GF“) und als zeitlicher Verlauf dargestellt (Abbildung 23, B). Die einzelnen Verläufe aller Zellen einer Behandlungsgruppe wurden dann gemeinsam als Median der Verläufe der einzelnen Zellen dargestellt.

Um die Beeinflussung der stimulationsinduzierten Calciumsignale nicht nur graphisch darzustellen, sondern auch statistisch auswerten zu können, wurden zwei Parameter etabliert, über die sich die Calciumsignale der Zellen eindeutig definieren: die maximal erreichte Fluoreszenzintensität als Maß für die Reaktionsstärke der Zelle und den stimulationsbedingten Anstieg der Fluoreszenzintensität über die Zeit als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit. Zur Berechnung der Reaktionsstärke (max. Ratio) wurde der Quotient aus maximaler Fluoreszenzintensität (Max) der Zelle nach Stimulation im Verhältnis zur minimalen Fluoreszenzintensität vor der Stimulation (Min) berechnet (Abbildung 23, A + B). Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Zelle berechnet sich aus der relativen maximalen Fluoreszenzänderung (max. Ratio) im Verhältnis zur zeitlichen Differenz zwischen Max und Min (Abbildung 23, A+B). Beide Parameter wurden für alle Zellen einer Behandlungsgruppe ermittelt und statistisch mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests (Rangtest) ausgewertet (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 23: Schematische Darstellung des absoluten (A) und relativen (B) Verlaufes der Fluoreszenzintensität und der Berechnung der Reaktionsparameter (C)**

**A:** Darstellung eines zeitlichen Verlaufes der Fluoreszenzintensität einer Zelle. Markiert sind der Bereich der Grundfluoreszenz der Zelle (GF), der Punkt der minimalen Fluoreszenzintensität vor der Stimulation (Min), sowie die maximale Fluoreszenzintensität während der Stimulation (Max). Die gelben Punkte stellen die Zeitpunkte nach der Stimulation dar, die zur Darstellung des Verlaufes der relativen Fluoreszenzintensität (B) auf den Bereich der Grundfluoreszenz normiert werden. Die Grundfluoreszenz errechnet sich aus dem Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten im Bereich 22-32 Sekunden nach Beginn der Messung.

**B:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Zelle, ermittelt aus der Normierung der Fluoreszenzintensitäten nach der Stimulation (A, gelbe Punkte) auf die Grundfluoreszenz vor der Stimulation (A, „GF“).

**C:** Mathematische Berechnung der Reaktionsparameter.

Die Werte von Max und Min, die für die oben beschriebenen Berechnungen benötigt werden, wurden mit Hilfe von Excel berechnet. Über die im Programm Excel implementierte Funktion „=Max()“ wurde die maximale Fluoreszenzintensität nach der Stimulation bestimmt, über die Funktion „=Vergleich()“ wurde zudem der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem dieses Maximum auftritt.

Die Berechnung der minimalen Fluoreszenzintensität vor der Stimulation hingegen konnte nicht über die Excel-eigene Funktion „=Min()“ berechnet werden, da diese Funktion nur die niedrigste Fluoreszenzintensität im Zeitfenster vor der Stimulation, nicht aber die Fluoreszenzintensität direkt zu

Beginn der Stimulation ausgegeben hätte. Dies hätte die Genauigkeit der Geschwindigkeitsberechnung sehr beeinflusst. Daher wurde zur Berechnung der minimalen Fluoreszenzintensität ein anderes Vorgehen gewählt. Zunächst wurde von jeder Zelle die durchschnittliche positive Fluoreszenzänderung berechnet. Dazu wurde rollierend die Fluoreszenzintensität an jedem Zeitpunkt der Messung von der Fluoreszenzintensität des darauffolgenden Zeitpunktes abgezogen ( $\Delta f = \text{Intensität Zeitpunkt } t+1 - \text{Intensität Zeitpunkt } t$ ). Wann immer diese Differenz größer als 0 – also positiv – ist, bedeutet das, dass eine Zunahme der Fluoreszenz vorliegt. Aus allen positiven Fluoreszenzänderungen wurde dann ein Mittelwert gebildet, um zu bestimmen, welche Fluoreszenzzunahmen die jeweilige Zelle während der gesamten Messung aufweist. Als Anfangspunkt des Fluoreszenzanstiegs nach der Stimulation der Zelle, also als Minimum, wurde dann der Zeitpunkt definiert, an dem die Differenz der Fluoreszenzintensität zwei aufeinanderfolgender Zeitpunkte ( $\Delta f$ ) das erste Mal größer ist als die durchschnittliche positive Fluoreszenzänderung der jeweiligen Zelle. Über die Funktion „=Vergleich()“ wurde der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem das Minimum auftritt.

### **4.3 TPM besitzt eine unterschiedliche Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA**

Mit Hilfe des etablierten Versuchsaufbaus zur multiplen Stimulation der verwendeten SHSY-5Y Zellen wurde in den folgenden Experimenten nun die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale genauer charakterisiert. Darüber hinaus wurde auch untersucht, ob die Anwesenheit von GABA und die damit verbundene Aktivierung des GABAergen Systems die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale beeinflusst.

#### **4.3.1 TPM verstärkt und beschleunigt ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit von GABA**

In einem ersten Versuch wurde zunächst die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit von GABA untersucht. Dazu wurden die mit Fluo-4 beladenen Zellen mit TPM vorbehandelt und anschließend nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit 5  $\mu\text{M}$  ACh stimuliert.

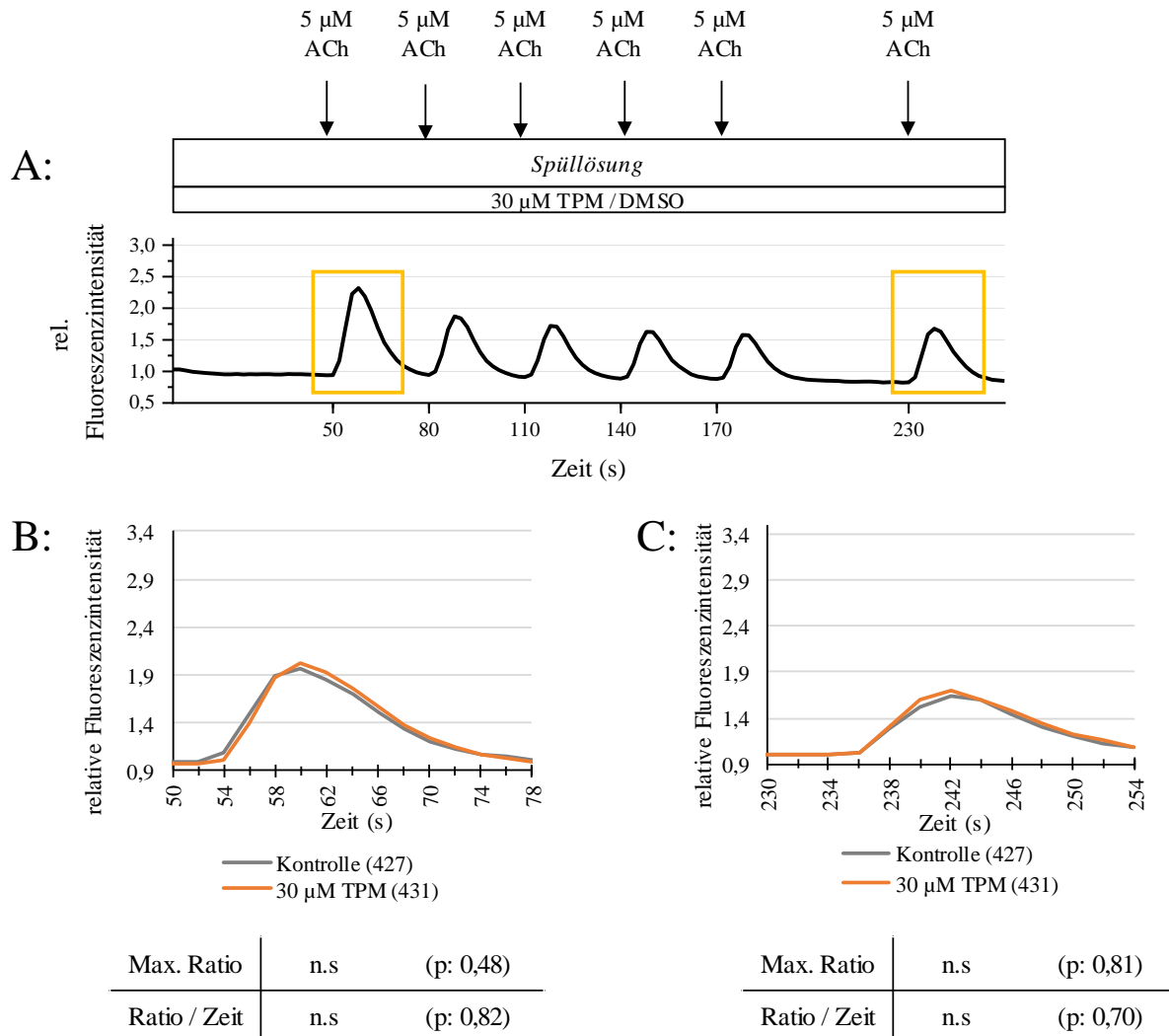
In Bezug auf die Vorbehandlungsdauer der gemessenen Neurone mit TPM finden sich in früheren Arbeiten zur Aufklärung des Wirkmechanismus von TPM sehr unterschiedliche und deutlich voneinander abweichende Angaben. In der überwiegenden Anzahl der durchgeführten Experimente wurde TPM über einen längeren Zeitraum (z.B. 5 Minuten bei Curia et al. 2004; bis zu 50 Minuten bei Gryder und Rogawski 2003) auf den gemessenen Neuronen vorinkubiert, allerdings wurden auch Versuche durchgeführt, in denen TPM unmittelbar vor der Stimulation zu den Zellen appliziert wurde (z.B. Gordey et al. 2000). Da in den meisten Arbeiten keine Erklärung für die jeweils angewendete Vorbehandlungsdauer angegeben ist, wurde im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit sowohl eine kurze Vorbehandlung, als auch eine längere Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen durchgeführt. Auf diese Weise konnte analysiert werden, welchen Einfluss die unterschiedliche Vorbehandlungsdauer auf die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt und die jeweiligen Wirkungen konnten miteinander verglichen werden.

Im Versuchsaufbau zur kurzen Vorbehandlung der Zellen mit TPM lag TPM dabei nur während der Messung und Stimulation der Zellen in der Spüllösung gelöst vor (Abbildung 24). Zur Untersuchung einer längeren Vorbehandlung der Zellen mit TPM wurden die Zellen in einem weiteren Versuch für 30 Minuten vor und während der Messung mit TPM inkubiert (Abbildung 25).

Bei beiden Versuchen lag kein signifikanter Unterschied in der Anzahl reagierender Zellen zwischen der Kontrollbehandlung (0,06% DMSO) und der Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  TPM vor. Bei der Untersuchung der schnell eintretenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale haben 64% der Zellen der Kontrollgruppe und 70% der Zellen der Behandlungsgruppe eine Reaktion auf die



Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh zeigt (T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p = 0,32$ ). Bei der Untersuchung der langsamer eintretenden Wirkung von TPM 30 Minuten vor und während der Messung haben 78% der Zellen der Kontrollgruppe und 75% der Zellen der Behandlungsgruppe eine Reaktion auf die Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh gezeigt (T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p = 0,66$ ).

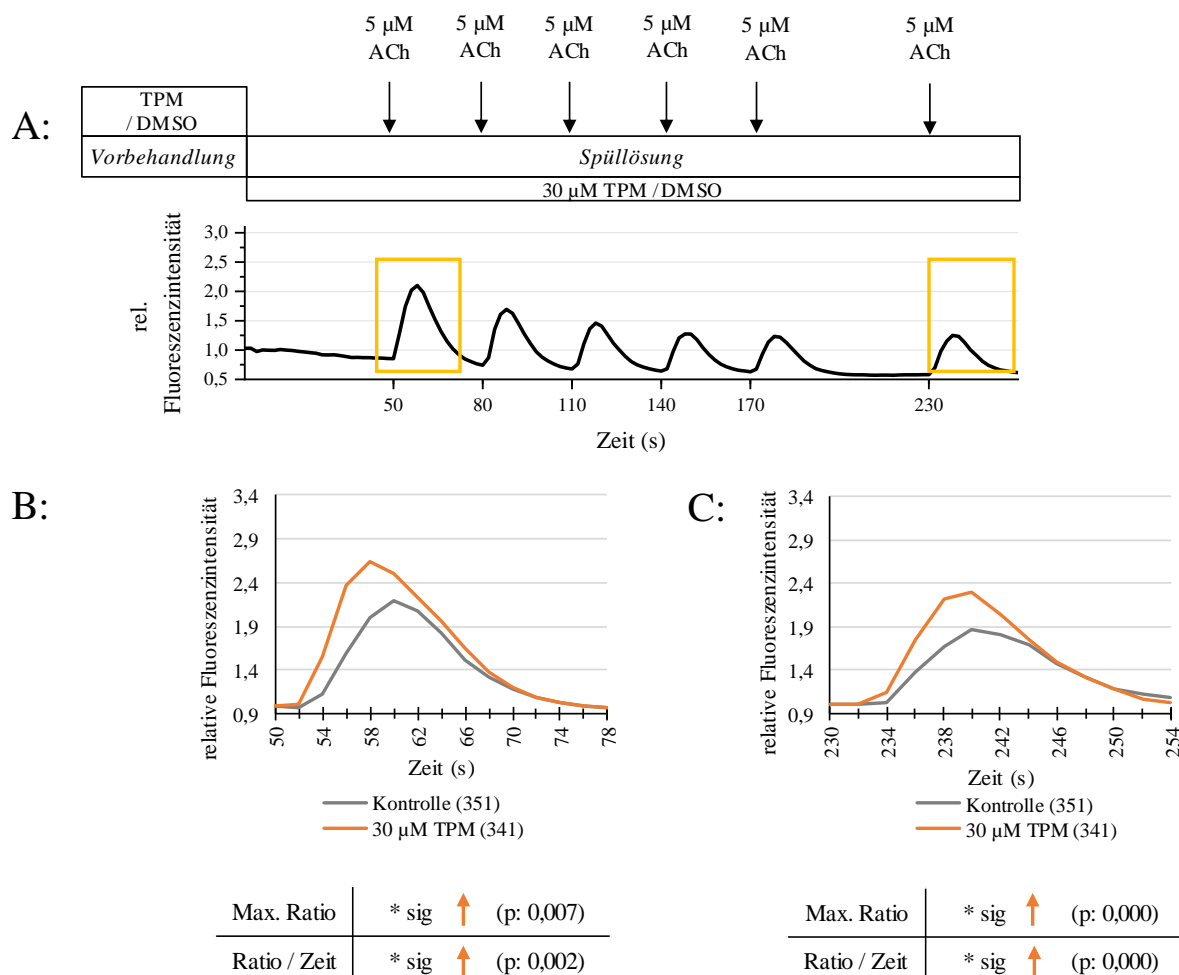


**Abbildung 24: Eine kurze Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit TPM hat keinen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität während der Messung. Während der Messung liegt 30  $\mu\text{M}$  TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) in der Spüllösung vor. Die Zellen wurden nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern, Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle  $n = 10$ ; 30  $\mu\text{M}$  TPM  $n = 9$ . Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant, p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass keine schnell eintretende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale nachweisbar ist. Das Vorliegen von 30  $\mu\text{M}$  TPM in der Spüllösung während der Messung beeinflusst die analysierten Reaktionsparameter der Reaktionsstärke und Reaktionsgeschwindigkeit also nicht.



**Abbildung 25: Die längere Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  TPM führt zu einer Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 30  $\mu\text{M}$  TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n=8, 30  $\mu\text{M}$  TPM n=7. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass durch die längere Vorbehandlung der Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit 30  $\mu\text{M}$  TPM eine signifikante Zunahme der Reaktionsstärke (max. Ratio) auftritt. Auch die Geschwindigkeit der Reaktion (Ratio/Zeit) liegt durch die Behandlung der Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  TPM erhöht vor. Beide Reaktionsparameter sind sowohl bei der ersten, als auch bei der letzten Stimulation durch TPM beeinflusst (Abbildung 25, B+C).

Durch diese Versuche konnte erstmals umfassend gezeigt werden, dass TPM auch ACh-induzierte Calciumsignale beeinflusst. Durch den Vergleich einer kurzen und einer längeren Vorbehandlungsdauer konnte zudem nachgewiesen werden, dass die TPM-Wirkung erst nach einer längeren Vorbehandlung nachweisbar ist, was mit den zumeist ebenfalls längeren Vorbehandlungszeiten früherer Arbeiten übereinstimmt und auch einen ersten Hinweis darauf gibt, dass die Wirkung von TPM möglicherweise tatsächlich auf einer Modulation intrazellulärer Signalkaskaden beruht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von TPM nicht über sehr lange Zeiträume bestehen bleibt, da nach einer Vorbehandlung der Zellen über 24 Stunden nur noch eine sehr schwache Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale nachweisbar ist (s. Anhang Abbildung A-1).

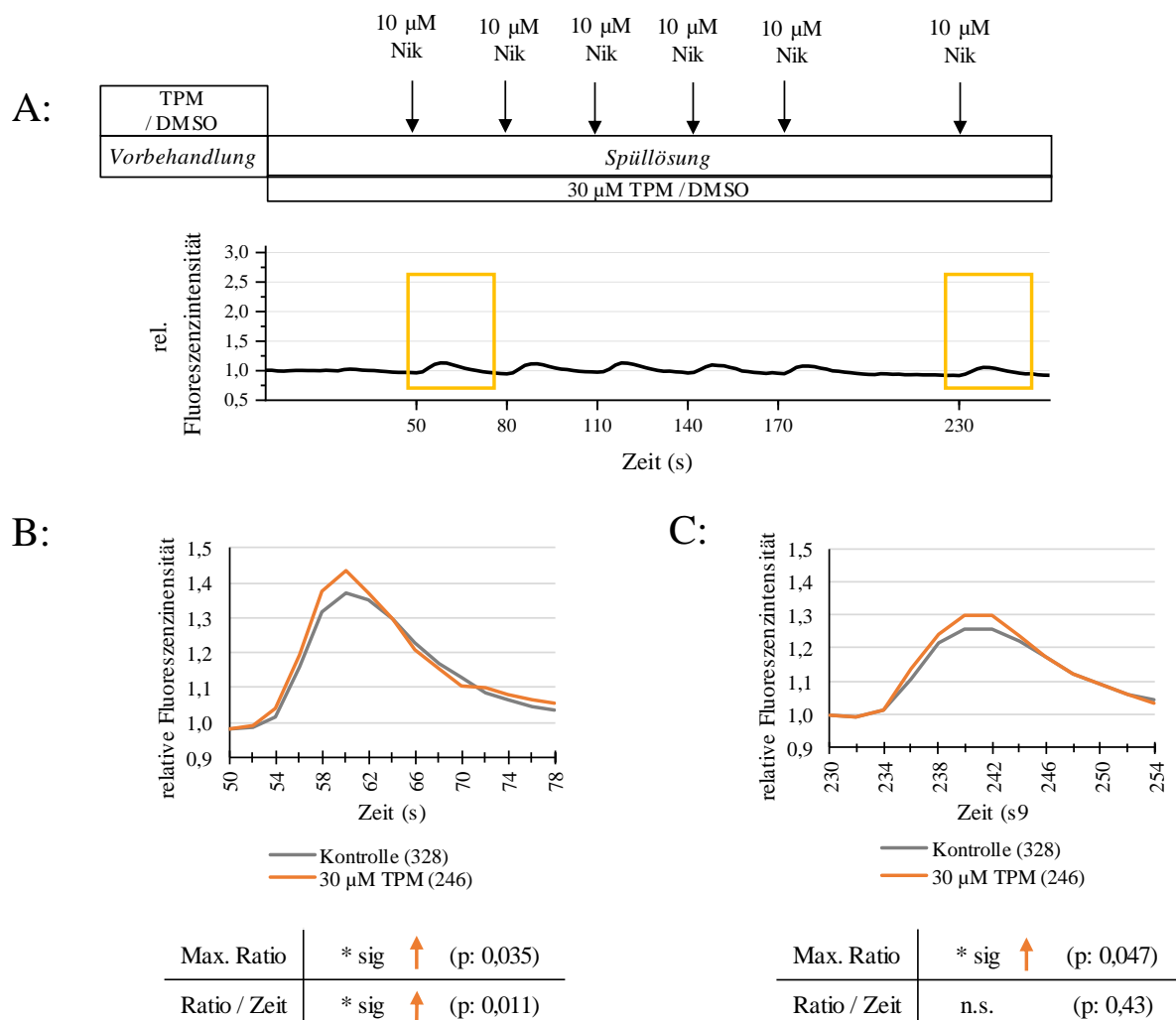
#### **4.3.1.1 TPM beeinflusst sowohl das ionotrope, als auch das metabotrope cholinerge System**

Die gemessenen und durch TPM beeinflussten ACh-induzierten Calciumsignale werden durch die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin an cholinerge Rezeptoren induziert. Dabei liegen zwei Klassen cholinergere Rezeptoren an Neuronen vor, ionotrope nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sowie metabotrope muskarine Acetylcholinrezeptoren (mAChR) (Dajas-Bailador 2002). Die Aktivierung nikotinischer AChR führt zu einem Einstrom von Calcium durch den Rezeptor, in dessen Folge auch spannungsabhängige Calciumkanäle (*voltage gated calcium channels*, VGCC) aktiviert werden. Die Aktivierung muskariner AChR hingegen führt zur Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden und zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Dajas-Bailador 2002).

Um zu ermitteln, ob die verstärkten und beschleunigten ACh-induzierten Calciumsignale durch TPM auf einer Beeinflussung ionotroper oder metabotroper AChR beruhen, wurden die SHSY-5Y Zellen im Folgenden mit spezifischen Agonisten beider Rezeptortypen anstelle von ACh stimuliert. Frühere Arbeiten zur Charakterisierung des cholinergen Systems an SHSY-5Y Zellen konnten dabei bereits zeigen, dass diese Zellen mit Nikotin als Agonist nikotinischer AChR stimulierbar sind, dass die Applikation von Muskarin als Agonist von mAChR allerdings keine Erregung auslöst (Gould et al. 1992). Vergleichbare Ergebnisse zur Ausbildung Nikotin- und Muskarin-induzierter Calciumsignale wurden auch im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nachgewiesen. Beim Vergleich von Nikotin-

und Muskarin-induzierten Calciumsignale konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der verwendeten SHSY-5Y Zellen mit 10  $\mu$ M Nikotin im Durchschnitt bei rund 45% der gemessenen Zellen ( $n = 1383$  gemessene Zellen) ein als Reaktion definierbares messbares Calciumsignal hervorruft. Die Stimulation der Zellen mit 50  $\mu$ M Muskarin hingegen löst nur bei 2% der gemessenen Zellen ( $n = 300$  gemessene Zellen) ein als Reaktion definierbares messbares Calciumsignal aus.

Da also keine Muskarin-induzierten Calciumsignale an den verwendeten Zellen nachweisbar sind, kann keine direkte Analyse der TPM-Wirkung nach Stimulation der Zellen mit diesem Agonisten muskariner Acetylcholinrezeptoren durchgeführt werden. Eine Analyse Nikotin-induzierter Calciumsignale in Anwesenheit von TPM ist hingegen möglich und wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit TPM vorbehandelt und multiple mit Nikotin stimuliert (Abbildung 26). Dabei lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 45%, TPM: 39%, T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p: 0,30$ ).



**Abbildung 26: TPM verstärkt und beschleunigt auch Nikotin-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. Nach der Vorbehandlung der Zellen für 30 Minuten mit 30 µM TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 10 µM Nikotin, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n = 9, 30 µM TPM n = 8. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es ist zu erkennen, dass unter Einfluss von 30 µM TPM sowohl bei der ersten als auch bei der letzten Stimulation eine signifikante Verstärkung Nikotin-induzierter Calciumsignale vorliegt. Eine signifikante Beschleunigung Nikotin-induzierter Calciumsignale (Ratio/Zeit) ist jedoch nur bei der ersten, nicht aber bei der letzten Stimulation nachweisbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass TPM neben ACh-induzierten auch Nikotin-induzierte Calciumsignale verstärkt. Eine Beschleunigung Nikotin-induzierter Calciumsignale beider analysierter Stimulationen ist jedoch nicht nachweisbar, wodurch sich die Wirkung von TPM auf dieses Reaktionsparameter zwischen der Acetylcholin- und Nikotin-Stimulation voneinander unterscheidet.

Da durch die Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Nikotin zudem deutlich weniger Zellen eine messbare Reaktion zeigen, als nach Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh und die Reaktion der Zellen nach der Stimulation mit Nikotin auch deutlich schwächer ausfällt, als nach Stimulation mit ACh, muss davon ausgegangen werden, dass die ACh-induzierten Calciumsignale in den verwendeten SHSY-5Y Zellen nicht alleinig auf einer Signaltransduktion über nAChR vermittelt werden. Auch wenn keine direkten Muskarin-induzierten Calciumsignale messbar sind, sprechen die Unterschiede zwischen Nikotin- und ACh-induzierten Calciumsignalen und deren Beeinflussung durch TPM dafür, dass das muskarine, metabotrope System sowohl eine zentrale Rolle sowohl bei der Induktion von Calciumsignalen, als auch bei der Wirkung von TPM darauf spielt.

Um zu zeigen, dass die metabotrope Signaltransmission tatsächlich eine zentrale Rolle bei der Vermittlung ACh-induzierter Calciumsignale besitzt, wurden zusätzlich auch die ACh-induzierten Calciumsignale in Anwesenheit von Thapsigargin ermittelt. Thapsigargin inhibiert SERCA-Pumpen am ER, welche kontinuierlich Calcium ins ER pumpen und so den Calciumspiegel des ER aufrechterhalten (Treiman et al. 1998). Die Hemmung der SERCA-Pumpe durch Thapsigargin blockiert dieses Auffüllen des ER, sodass sich das ER kontinuierlich entleert und als Calciumspeicher nicht mehr zur Verfügung steht (Grudt et al. 1996, Treiman et al. 1998), wodurch ACh-induzierte Calciumströme ohne Beteiligung der Freisetzung von Calcium aus dem ER analysiert werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur noch bei 7% der gemessenen Zellen ( $n = 377$  gemessene Zellen) eine Reaktion auf die Stimulation mit ACh nachweisbar ist, wenn die Zellen für 30 Minuten vor und während der Messung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin inkubiert werden. Somit sind die ACh-induzierten Calciumsignale stark von der Calcium-Freisetzung aus dem ER abhängig.

Im Rahmen dieses Versuches konnte auch gezeigt werden, dass die Wirkung von TPM diese Abhängigkeit ACh-induzierter Calciumsignale von der Freisetzung von Calcium aus dem ER beeinflusst. Werden die Zellen mit 0,1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin unter Einfluss von 30  $\mu\text{M}$  TPM für 30 Minuten vor und während der Messung inkubiert, zeigen 24% der Zellen ( $n = 514$  gemessene Zellen) eine Reaktion auf die Stimulation mit ACh.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte also gezeigt werden, dass die ACh-induzierten Calciumsignale in den hier verwendeten SHSY-5Y Zellen sowohl durch nAChR, als auch durch mAChR vermittelt werden und es konnten klare Hinweise darauf gefunden werden, dass die Verstärkung und Beschleunigung der ACh-induzierten Calciumsignale durch TPM auf einer

Modulation ionotroper und metabotroper AChR beruht. Zudem scheint TPM die Abhängigkeit ACh-induzierter Calciumsignale von der Calcium-Freisetzung aus dem ER zu modulieren.

#### **4.3.2 TPM hemmt ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA**

Die besondere Wirkungseigenschaft von TPM im Vergleich zu anderen antiepileptischen Wirkstoffen besteht darin, dass TPM neben der erregenden auch die hemmende Signaltransmission beeinflusst. Dabei konnten verschiedene Forschungsarbeiten zeigen, dass TPM die GABAerge Signaltransmission potenzieren kann (White et al. 1997, White et al. 2000, Gordey et al. 2000, Simeone et al. 2006). Ein weiterer wichtiger Aspekt der TPM-Wirkung hingegen wurde bisher noch nicht genauer untersucht, nämlich ob die Anwesenheit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA auch einen Einfluss auf die Wirkung von TPM besitzt.

Im physiologischen Umfeld eines neuronalen Netzwerkes stehen Erregung und Hemmung zu jeder Zeit in enger Wechselwirkung zueinander und beeinflussen sich gegenseitig (Bhatia et al. 2019, He und Cline 2019). Aus diesem Grund ist es unbedingt notwendig, diesen Aspekt auch bei der Analyse der Wirkungseigenschaften von TPM zu berücksichtigen und die Wirkung von TPM auch im physiologischen Zusammenspiel zwischen Erregung und Hemmung zu analysieren.

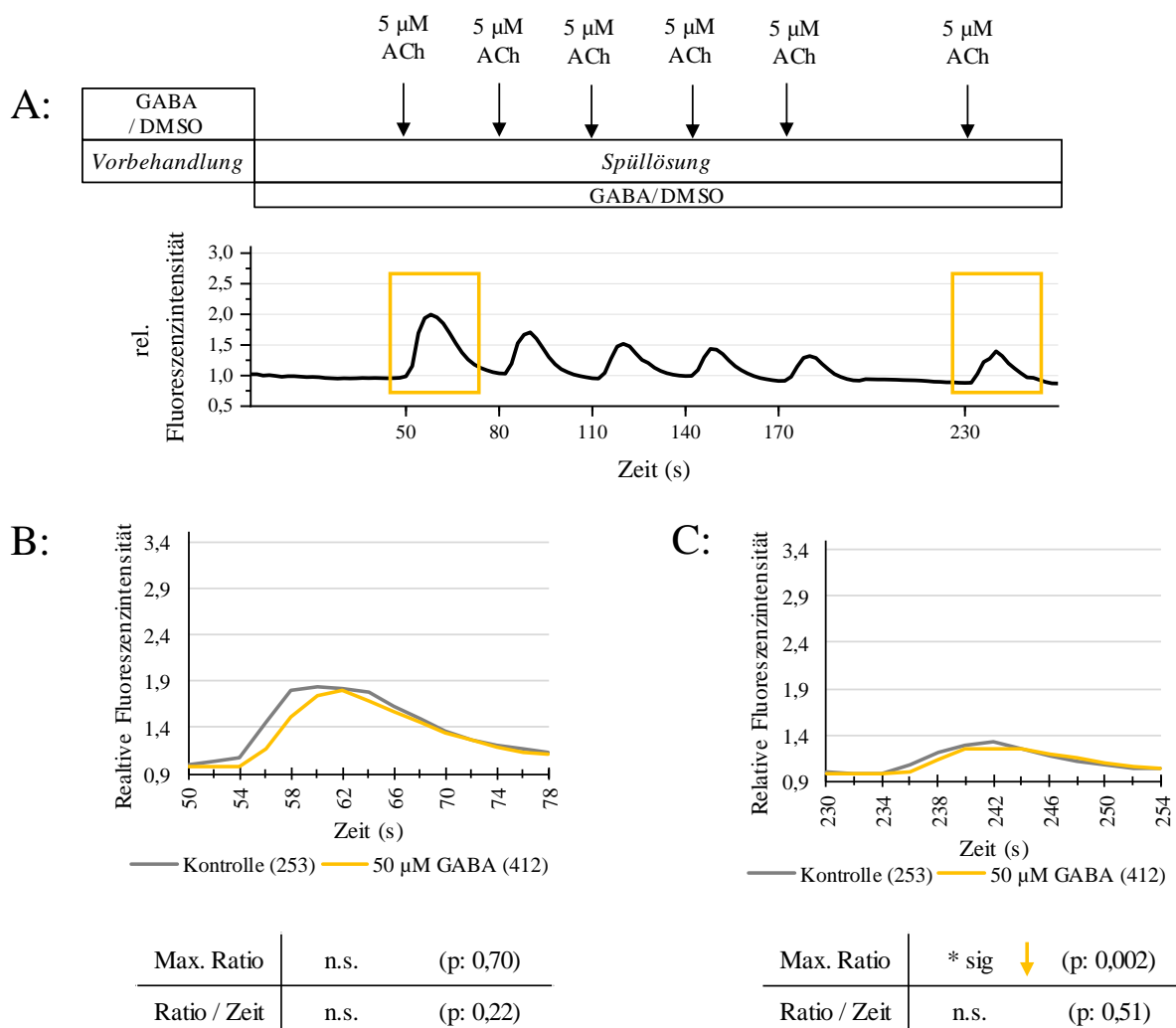
Wie das cholinerge System setzt sich auch das GABAerge System von Neuronen aus ionotropen GABA<sub>A</sub> und metabotropen GABA<sub>B</sub> Rezeptoren zusammen, sodass die Zugabe des Neurotransmitters GABA sowohl einen Einstrom von Chloridionen durch GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, als durch eine Aktivierung G-Protein gekoppelter Signalkaskaden nach Aktivierung von GABA<sub>B</sub> Rezeptoren hervorrufen kann (Kuriyama et al. 1993). Über beide Prozesse kann die Anwesenheit von GABA einen starken Einfluss auf die Physiologie der Neurone nehmen und somit möglicherweise auch die Wirkung von TPM beeinflussen. Nachdem in den vorherigen Experimenten eine verstärkende und beschleunigende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit von GABA nachgewiesen und genauer charakterisiert werden konnte, wird daher nun die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale auch in Anwesenheit von GABA untersucht.

Dazu muss zunächst untersucht werden, welchen Einfluss der inhibitorische Neurotransmitter GABA alleine auf ACh-induzierte Calciumsignale an den verwendeten SHSY-5Y besitzt. Das Vorliegen des GABAergen Systems an SHSY-5Y Zellen wurde in früheren Forschungsarbeiten bisher vor allem über den Nachweis der mRNA-Expression verschiedener GABA-Rezeptor Untereinheiten nachgewiesen (Korecka et al. 2013, Xing et al. 2019). Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Expressionsanalysen zum Teil deutlich voneinander. Während Korecka et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013 nur die Expression der GABA<sub>A</sub>-  $\beta$ 3 Untereinheit und der GABA<sub>B</sub>1 Untereinheit nachweisen konnten, haben Xing et al. 2019 gezeigt, dass SHSY-5Y Zellen auch die  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\gamma$ 1-,  $\delta$  und  $\rho$ -Untereinheiten der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, sowie die GABA<sub>B</sub>2 Untereinheit exprimieren.

Da sich aufgrund der unterschiedlichen Ergebnissen dieser Expressionsanalysen kein eindeutiger Rückschluss über das Vorliegen eines funktionellen GABAergen System an den verwendeten SHSY-5Y Zellen ziehen lässt, wurde der Einfluss von GABA auf ACh-induzierten Calciumsignale im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit zunächst experimentell untersucht. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit GABA inkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 27). Eine GABA-induzierte Hemmung der Neurone lässt sich dabei anhand von Calcium-Imaging Experimenten indirekt über eine Dämpfung ACh-induzierter Calciumsignale in Anwesenheit von GABA nachweisen (Raccuglia und Mueller 2014).

In diesem Versuch haben 86% der Zellen eine Reaktion auf die Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh gezeigt, bei den Zellen der Behandlungsgruppe lag der Wert bei 82%, sodass sich in Bezug auf den Anteil reagierender Zellen zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein Unterschied andeutet. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl unabhängiger Experimente ( $n < 5$ ) in diesem Fall nicht durchgeführt.





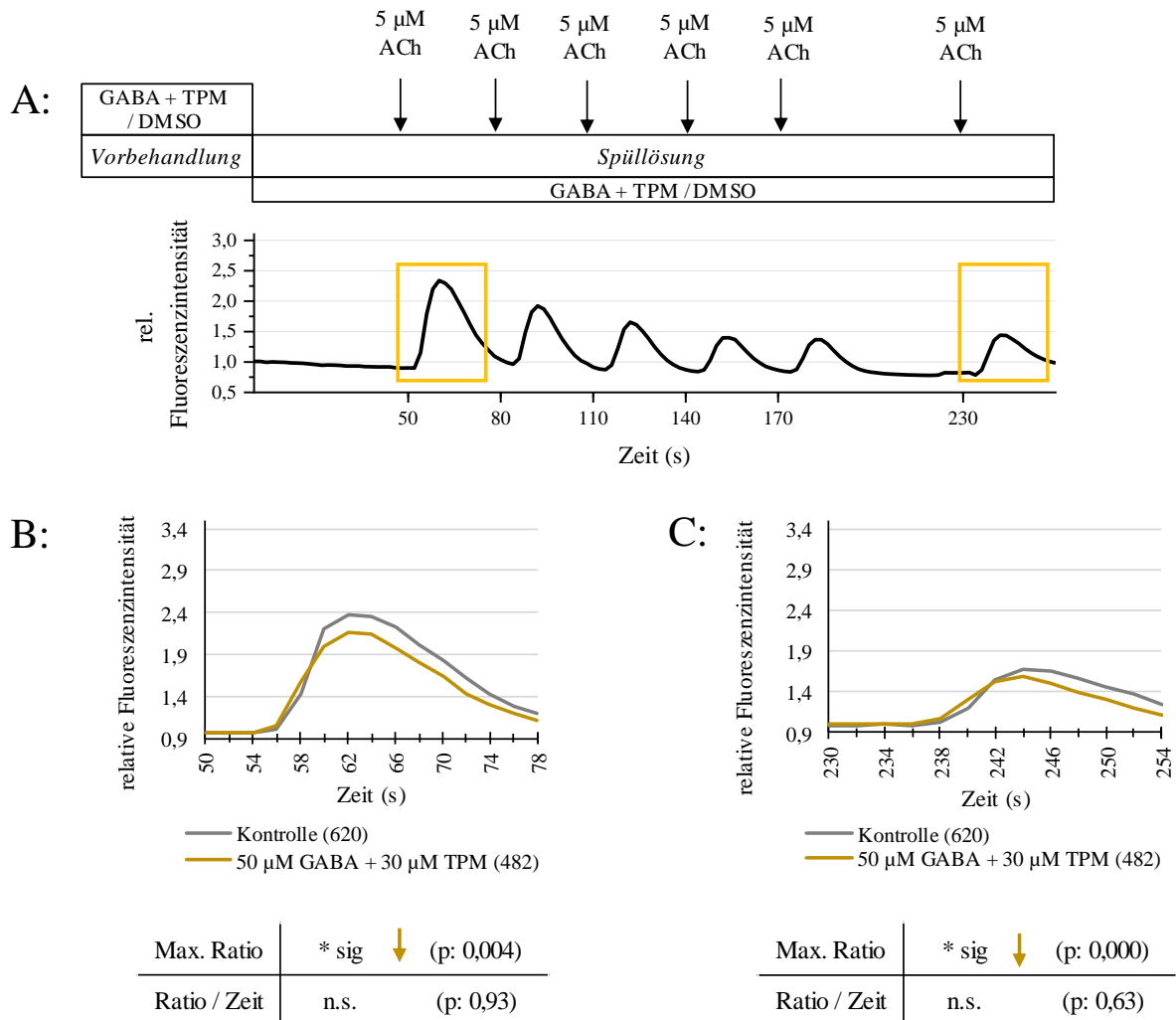
**Abbildung 27: Die Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit GABA hat nur einen schwachen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während multipler Stimulation mit 5 µM ACh**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 50 µM GABA (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5 µM ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: jeweils n= 4. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von GABA nur bei der letzten Stimulation eine Reduktion der Reaktionsstärke (max. Ratio) ACh-induzierter Calciumsignale hervorruft, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) unbeeinflusst ist. Bei der ersten Stimulation hingegen liegt weder eine signifikante Beeinflussung der Reaktionsstärke (max. Ratio), noch der Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) durch die Anwesenheit von GABA vor.

Nachdem anhand dieses Ergebnisses gezeigt werden konnte, dass die Vorbehandlung der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  GABA selbst keinen starken Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale besitzt, wurde nun in einem weiteren Versuch untersucht, ob die Anwesenheit von GABA einen Einfluss auf die Wirkung von TPM besitzt. Dazu wurden die SHSY-5Y Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit TPM + GABA inkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 28, A). Dabei lag kein signifikanter Unterschied in der Anzahl reagierender Zellen zwischen der Kontrollbehandlung (0,06% DMSO) und der Vorbehandlung mit 30  $\mu\text{M}$  TPM + 50  $\mu\text{M}$  GABA vor. In beiden Behandlungsgruppen haben 85% der Zellen eine Reaktion auf die Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh gezeigt, sodass sich der Anteil reagierender Zellen in beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheidet (T-Test, zweiseitig, ungepaart, p: 0,91).



**Abbildung 28: In Anwesenheit von GABA ist ein hemmender Einfluss von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale nachweisbar**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 30 µM TPM + 50 µM GABA (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5 µM ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n= 6, 50 µM GABA+30 µM TPM n= 5. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es ist zu erkennen, dass TPM in Anwesenheit von GABA eine Dämpfung ACh-induzierter Calciumsignale hervorruft. Dabei ist bei beiden analysierten Stimulation eine stabile Reduktion der Reaktionsstärke (max. Ratio) ohne Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) nachweisbar.

Anhand dieser Ergebnisse konnte also gezeigt werden, dass sich die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Ab- und Anwesenheit von GABA unterscheidet, obwohl GABA selbst keinen starken Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt. Während die Vorbehandlung der Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  TPM in Abwesenheit von GABA ACh-induzierte Calciumsignale verstärkt und beschleunigt, liegt in Anwesenheit von GABA ein hemmender Einfluss von TPM auf die Reaktionsstärke ACh-induzierter Calciumsignale vor.

#### **4.4 Identifizierung intrazellulärer Zielstrukturen mit Bezug zur hemmenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale**

Über die Wirkung von TPM ist bisher bekannt, dass TPM GABA-induzierte Ströme und Chloridsignale potenzieren kann (White et al. 1997, White et al. 2000, Gordey et al. 2000, Simeone et al. 2006). Das hier erhaltene Ergebnis, dass sich die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA von einer stimulierenden zu einer hemmenden Wirkung ändert, stellt somit einen vollkommen neuen Aspekt der Wirkung von TPM dar, welcher im Folgenden genauer analysiert wird. Dabei soll vor allem die Grundlage der hemmenden TPM-Wirkung in Anwesenheit von GABA genauer charakterisiert werden.

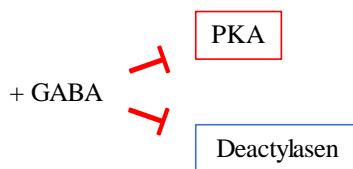
Das erhaltene Ergebnis, dass die Anwesenheit von GABA die Wirkung von TPM beeinflusst, lässt sich am ehesten damit erklären, dass GABA möglicherweise zentrale regulatorische Signalprozesse moduliert und dadurch die Physiologie der Zellen so beeinflusst, dass an diesen Zellen eine hemmende Wirkung von TPM auftritt. Deshalb soll in den folgenden Versuchen gezielt untersucht werden, welche regulatorischen Prozesse möglicherweise durch GABA beeinflusst werden und somit mit der Ausbildung der hemmenden TPM-Wirkung in Verbindung stehen.

Dazu wird in den folgenden Versuchen der Einfluss von GABA auf intrazelluläre Zielproteine mit Hilfe spezifischer Inhibitoren nachgestellt. Diese Inhibitoren werden, anstelle von GABA, gemeinsam mit TPM auf den Zellen inkubiert und es wird der Einfluss dieser Behandlung auf die ACh-induzierte Calciumsignale ermittelt. Tritt dabei unter Einfluss des Inhibitors die gleiche TPM-Wirkung auf, wie sie in Anwesenheit von GABA nachweisbar war, so kann daraus geschlossen werden, dass die Hemmung dieser Zielstruktur eine potentielle Funktion bei der Ausbildung der hemmenden TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt.

##### **4.4.1 Veränderungen im Vorliegen posttranslationaler Proteinmodifikationen wirken sich auf die Wirkung von TPM aus**

Neben der direkten Hyperpolarisation von Neuronen über den Einstrom von Chloridionen über ionotrope GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kann die Aktivierung des GABAergen Systems auch zu einer Beeinflussung posttranslationaler Proteinmodifikationen führen. So konnte gezeigt werden, dass GABA

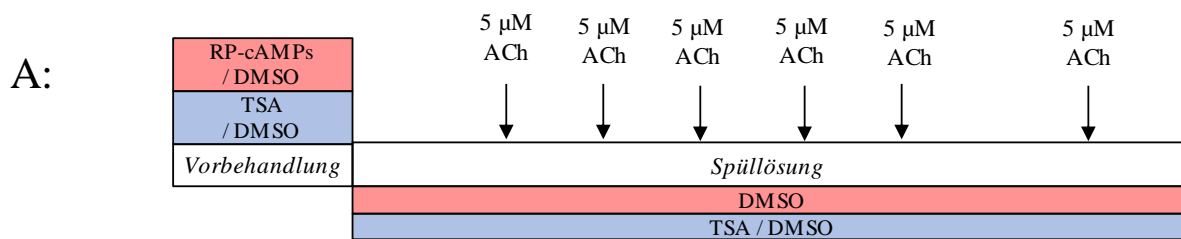
eine Hemmung von Adenylatcyclasen (AC) vermitteln kann, was zu einer Reduktion der intrazellulären Menge des *second messengers* cAMP führen kann (Terunuma 2018). Da dies eine Reduktion der Proteinkinase A (PKA)-Aktivität zur Folge haben kann, kann die Anwesenheit von GABA auf diese Weise das Vorliegen von Proteinphosphorylierungen in der Zelle beeinflussen (Terunuma 2018, vgl. Abbildung 29). Darüber hinaus gibt es auch bereits erste Hinweise darauf, dass GABA die Hemmung von Protein-Deacetylasen verursacht und so das Vorliegen von Proteinacetylierungen modulieren kann (Xing et al. 2019, vgl. Abbildung 29). Da Ängehagen et al. (2004) bereits Hinweise darauf finden konnten, dass die Aktivität der PKA eine Rolle für die Wirkung von TPM auf Kainat-induzierte Calciumsignale spielt, ist es durchaus möglich, dass eine durch GABA vermittelte Beeinflussung posttranslatonaler Proteinmodifikationen die Grundlage für die hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA darstellt.



**Abbildung 29: Einfluss des GABAergen Systems auf PKA und Proteindeacetylasen**

Deshalb soll untersucht werden, ob eine Hemmung der PKA oder der Proteindeacetylasen eine Rolle für die Ausbildung der hemmenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale spielt. Dazu wurde der Einfluss von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren der PKA und Proteindeacetylasen untersucht. Als Inhibitor der PKA wurde dazu der Wirkstoff RP-cAMPs verwendet, als Inhibitor von Proteindeacetylasen Trichostatin A (TSA).

Zunächst wurde in Vorversuchen ermittelt, ob die Vorbehandlung der Zellen mit RP-cAMPs oder TSA alleine einen Einfluss auf den ACh-induzierten Calciumeinstrom besitzt, um einen möglichen Einfluss des Inhibitors von der Wirkung von TPM in Anwesenheit des Inhibitors unterscheiden zu können. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten vor der Messung mit RP-cAMPs (Abbildung 30, rote Markierung) oder vor und während der Messung mit TSA (Abbildung 30, blaue Markierung) vorinkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert. Bei der Untersuchung des Einflusses von RP-cAMPs auf ACh-induzierte Calciumsignale lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 86%, RP-cAMPs 85%, T-Test, zweiseitig, ungepaart, p: 0,56), bei der Untersuchung des Einflusses von TSA auf ACh-induzierte Calciumsignale weicht der Anteil reagierender Zellen zwar voneinander ab (Kontrolle: 60%, TSA: 80%), allerdings konnte aufgrund der geringen Anzahl durchgeführter Experimente ( $n < 5$ ) keine statistische Auswertung vorgenommen werden.



## 1. Stimulation

## 6. Stimulation

B:

	Kontrolle - RPcAMPs	
Max. Ratio	n.s.	(p: 0,06)
Ratio / Zeit	n.s.	(p: 0,50)

C:

	Kontrolle - RPcAMPs	
Max. Ratio	* sig ↓	(p: 0,001)
Ratio / Zeit	* sig ↓	(p: 0,022)

D:

	Kontrolle - TSA	
Max. Ratio	n.s.	(p: 0,16)
Ratio / Zeit	n.s.	(p: 0,34)

E:

	Kontrolle - TSA	
Max. Ratio	n.s.	(p: 0,32)
Ratio / Zeit	n.s.	(p: 0,10)

**Abbildung 30: Die Vorbehandlung der Zellen mit TSA führt im Gegensatz zur die Vorbehandlung mit RP-cAMPs zu keiner Beeinflussung ACh-induzierter Calciumsignale**

A: Schematischer Ablauf der Messungen. 10 µM RP-cAMPs (rote Markierung) oder 0,5 µM TSA (blaue Markierung) wurde jeweils 30 Minuten vor bzw. vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert (Kontrolle jeweils 0,06% DMSO). Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert.

B, C: Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (RP-cAMPs, n = 441 Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,06% DMSO, n = 492 Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: jeweils n = 6. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

D, E: Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (TSA, n = 235 Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,06% DMSO, n = 420 Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n = 5, TSA n = 4. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

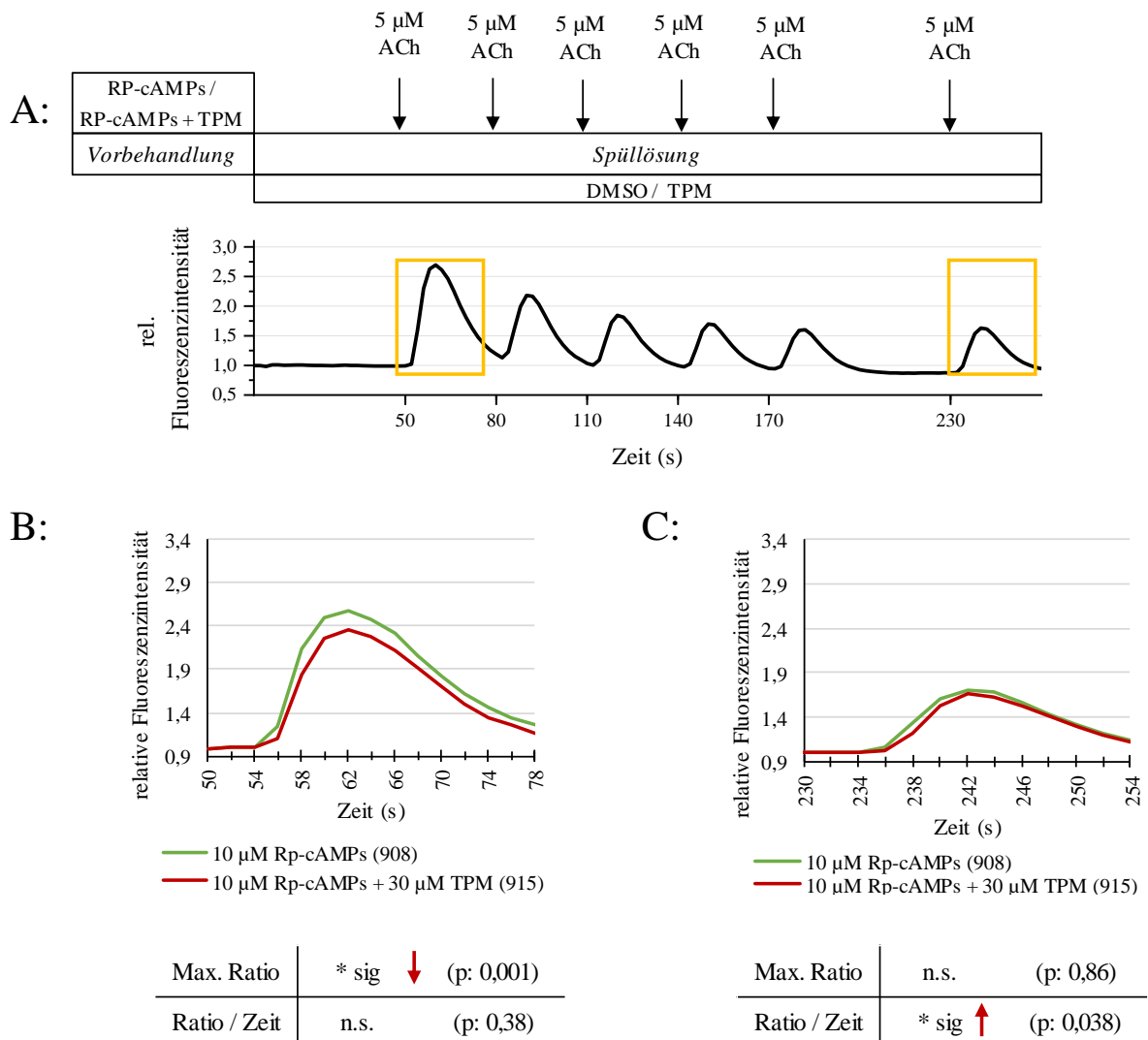
Bei der Auswertung der ACh-induzierten Calciumsignale in Anwesenheit von RP-cAMPs oder TSA konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PKA mit RP-cAMPs keine Beeinflussung des ACh-induzierten Calciumeinstroms bei der ersten Stimulation hervorruft. Bei der letzten Stimulation hingegen tritt eine signifikante Reduktion der Reaktionsstärke (max. Ratio) und -geschwindigkeit bei den mit RP-cAMPs vorbehandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 30, B+C).

Diese Beeinflussung des ACh-induzierten Calciumeinstroms durch RP-cAMPs muss bei der Interpretation weiterer Ergebnisse mit dem PKA-Inhibitor berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zur Vorbehandlung mit RP-cAMPs führt die Vorbehandlung der Zellen mit TSA vor und während der Messung zu keiner Beeinflussung ACh-induzierten Calciumsignale (Abbildung 30, D+E). Somit muss die Wirkung von TSA selbst auf ACh-induziert Calciumsignale im Folgenden nicht näher berücksichtigt werden.

Im nächsten Schritt wurde nun die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit einer PKA- oder Deacetylase-Inhibition untersucht. Tritt in Anwesenheit von RP-cAMPs oder TSA ebenfalls eine hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale auf, wie sie auch in Anwesenheit von GABA nachweisbar ist, so kann daraus geschlussfolgert werden, dass die Hemmung der PKA oder der Proteindeacetylasen eine Rolle bei der Vermittlung der hemmenden Wirkung von TPM spielen.

Bei der Untersuchung der Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit der PKA-Inhibition wurden die Zellen für 30 Minuten vor der Messung mit einer Kombination aus TPM + RP-cAMPs vorbehandelt und nach dem Standardstimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 31). Dabei lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 87%, RP-cAMPs + TPM: 86%, T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p: 0,70$ ).



**Abbildung 31: TPM zeigt in Anwesenheit von RPsAMPs nur bei der ersten Stimulation eine hemmende Wirkung auf die ACh-induzierten Calciumsignale**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 10  $\mu$ M RP-cAMPs + 30  $\mu$ M TPM (Kontrolle: 10  $\mu$ M RPsAMPs) wurde 30 Minuten vor der Messung auf den Zellen inkubiert, während der Messung wurden die Zellen mit TPM alleine (Kontrolle: 0,06% DMSO) überspült und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

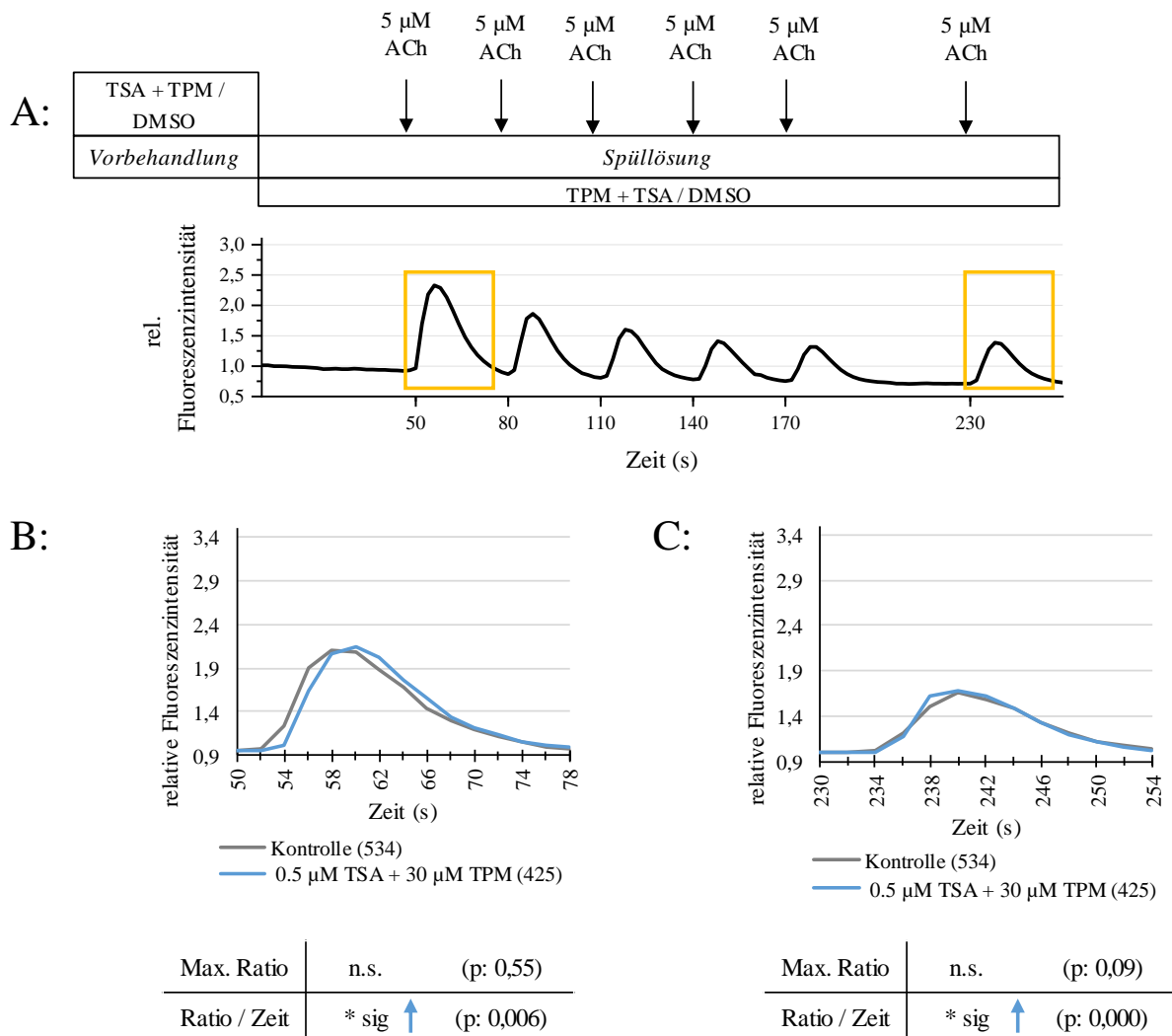
**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente jeweils n = 9. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang

Es konnte gezeigt werden, dass TPM unter Einfluss des PKA-Inhibitors RP-cAMPs nur bei der ersten Stimulation einen hemmenden Einfluss auf die maximale Reaktionsstärke (max. Ratio) besitzt. Eine Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) durch TPM ist bei der ersten Stimulation in Anwesenheit des PKA-Inhibitors nicht nachweisbar. Bei der Analyse der letzten Stimulation sind durch die Vorbehandlung beschleunigte ACh-induzierte Calciumsignale nachweisbar.



Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass TPM in Anwesenheit der PKA-Inhibition eine schwache hemmende Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt, welche jedoch nicht mit der Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA übereinstimmt.

Im nächsten Versuch wurde die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit des Deacetylase-Inhibitors TSA untersucht. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten vor und während der Messung mit TPM+TSA vorbehandelt und nach dem Standardstimulationsprotokoll mit ACh stimuliert (Abbildung 32). Dabei lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 76%, TSA+TPM 70%, T-Test, zweiseitig, ungepaart, p: 0,47).



**Abbildung 32: TPM zeigt in Anwesenheit von TSA keinen hemmenden Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh**

A: Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 0,5  $\mu$ M TSA + 30  $\mu$ M TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

B, C: Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbereitung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Kontrolle 7, 30 TPM+ 0,5 TSA: 8. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es ist zu erkennen, dass unter Einfluss von TSA weder bei der ersten, noch bei der letzten Stimulation eine Wirkung von TPM auf die Reaktionsstärke (max. Ratio) ACh-induzierter Calciumsignale nachweisbar ist. Allerdings tritt eine Verstärkung der Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) bei beiden analysierten Stimulationen auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass TPM durch die Inhibition der

Proteindeacetylasen mit TSA keine Hemmung ACh-induzierter Calciumsignale hervorruft, wie es in Anwesenheit von GABA nachweisbar war.

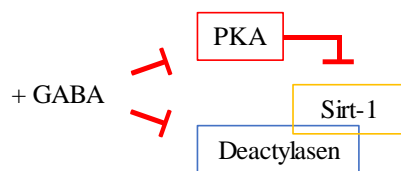
Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Anwesenheit von R<sub>P</sub>cAMPs und TSA die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale zwar jeweils beeinflusst, aber dass diese Beeinflussung nicht mit der Beeinflussung übereinstimmt, wie sie in Anwesenheit von GABA nachweisbar ist.

#### 4.4.2 TPM besitzt eine hemmende Wirkung in Anwesenheit einer Sirt-1 Inhibition

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass weder die Hemmung der PKA, noch die Hemmung der Deacetylasen ausreichend ist, um die Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA nachzubilden.

Allerdings kann die Aktivität der PKA und der Deacetylasen nicht nur durch GABA beeinflusst werden. Vielmehr können sich diese verschiedenen Formen posttranslationaler Proteinmodifikationen auch gegenseitig beeinflussen (Yang und Seto, 2008). Dies ist beispielsweise bei der Deacetylase Sirt-1 der Fall. So konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität nicht nur durch das Vorliegen des Cofaktors NAD<sup>+</sup>, sondern auch durch PKA-vermittelte Phosphorylierungen reguliert werden kann (Sasaki et al. 2008, Gerhart-Hines et al. 2011, Zhang et al. 2020).

Da die Anwesenheit von GABA, wie bereits beschrieben, sowohl die Aktivität der PKA, als auch die Aktivität von Proteindeacetylasen beeinflussen kann, könnte die Aktivität von Sirt-1, als eine durch die PKA regulierte Proteindeacetylase, auf diese Weise sozusagen doppelt vom Einfluss eines aktiven GABAergen Systems betroffen sein (vgl. Abbildung 33).

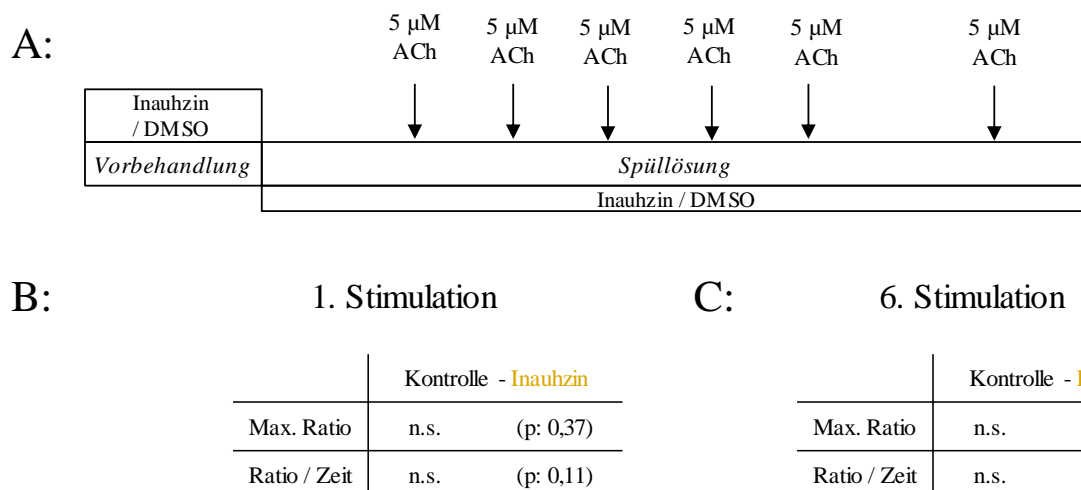


**Abbildung 33: Die Deacetylase Sirt-1 kann in Anwesenheit von GABA doppelt reguliert sein**

Deshalb kommt Sirt-1 als wichtige intrazelluläre Zielstruktur mit einer möglichen Rolle bei der Ausbildung der hemmenden Wirkung von TPM in Frage und wird im Folgenden näher untersucht. Dazu wurde Sirt-1 mit Hilfe des spezifischen Inhibitors Inauhzin inhibiert und die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale unter Einfluss dieser Sirt-1 Inhibition analysiert.

Zunächst wurde in einem Vorversuch ermittelt, ob die Vorbehandlung der Zellen mit Inauhzin alleine bereits einen Einfluss auf den ACh-induzierten Calciumeinstrom besitzt. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten vor und während der Messung mit Inauhzin vorinkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit 5  $\mu$ M ACh stimuliert (Abbildung 34). Dabei lag kein signifikanter

Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 81%, Inauhzin 79%, T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p = 0,75$ ).



**Abbildung 34: Die Vorbehandlung der Zellen mit 0,2  $\mu\text{M}$  Inauhzin hat keinen Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  ACh**

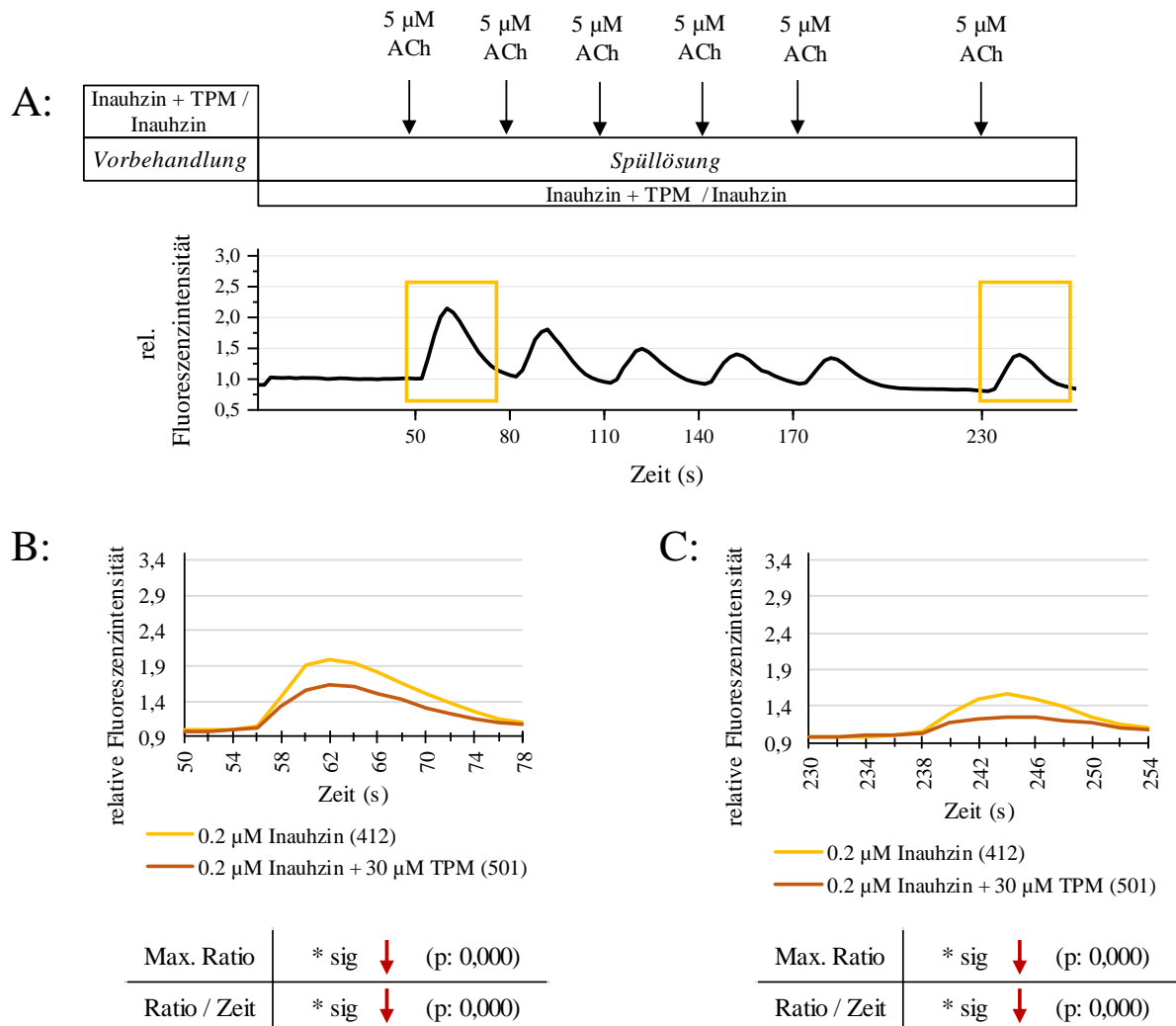
**A:** Schematischer Ablauf der Messungen. 0,2  $\mu\text{M}$  Inauhzin (Kontrolle: 0,08% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert.

**B, C:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (0,2  $\mu\text{M}$  Inauhzin,  $n = 493$  Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,08% DMSO,  $n = 452$  Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle  $n = 5$ , Inauhzin  $n = 6$ . Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant.  $p$ -Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit 0,2  $\mu\text{M}$  Inauhzin keinen Einfluss auf die ausgewerteten Reaktionsparameter besitzt. Weder die maximale Reaktionsstärke (max. Ratio), noch die Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit) der ACh-induzierten Calciumsignale ist durch die Behandlung mit dem Sirt-1 Inhibitor beeinflusst. Somit muss die Wirkung von Inauhzin selbst auf ACh-induziert Calciumsignale im Folgenden nicht näher berücksichtigt werden.

Im nächsten Schritt wurde nun die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit einer Sirt-1 Inhibition untersucht. Tritt in Anwesenheit von Inauhzin ebenfalls eine hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale auf, wie sie auch in Anwesenheit von GABA nachweisbar ist, so kann daraus geschlossen werden, dass die Hemmung der Sirt-1 eine Rolle bei der Vermittlung der hemmenden Wirkung von TPM spielt.

In diesem Versuch wurden die Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit TPM + Inauhizin inkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 35). Dabei lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 72%, Inauhizin + TPM 76%, T-Test, zweiseitig, ungepaart, p: 0,88).



**Abbildung 35: TPM zeigt in Anwesenheit des Sirt-1 Inhibitors Inauhizin eine hemmende Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit ACh**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 0,2  $\mu$ M Inauhizin + 30  $\mu$ M TPM (Kontrolle: 0,08% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente jeweils n = 5. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Die Zellen, die mit TPM + Inauhzin vorbehandelt wurden, zeigen bei beiden analysierten Stimulationen sowohl eine Reduktion der Reaktionsstärke (max. Ratio), als auch der Reaktionsgeschwindigkeit (Ratio/Zeit). Somit zeigt TPM in Anwesenheit von Inauhzin nicht nur die gleiche hemmende Wirkung auf die Reaktionsstärke ACh-induzierter Calciumsignale, wie sie auch in Anwesenheit von GABA nachweisbar war, sondern hemmt darüber hinaus auch die Reaktionsgeschwindigkeit der ACh-induzierten Calciumsignale.

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Deacetylase Sirt-1 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der hemmenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale spielt.

#### 4.4.3 Die Wirkung von TPM ist translationsabhängig

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass eine GABA-vermittelte Inhibition von Sirt-1 eine mögliche Grundlage für die hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA darstellt.

Bei Sirt-1 handelt es sich um eine Deacetylase, welche sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern von Zellen aktiv ist, weshalb eine Hemmung von Sirt-1 in beiden Kompartimenten eine Zunahme von Proteinacetylierungen hervorrufen kann (Tanno et al. 2007, Haigis und Sinclair 2010).

Eine wichtige Klasse von Proteinen, welche durch Acetylierungen reguliert werden kann, stellen die Histonproteine im Zellkern dar. Dabei führt das Anfügen eines Acetylrestes zum Vorliegen einer zusätzlichen negativen Ladung am Histonprotein, wodurch die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Histon und der darum gewundenen, ebenfalls negativ geladenen, DNA erhöht wird (Gregory et al. 2001). Da auf diese Weise die Zugänglichkeit der DNA für Komponenten der Transkriptionsmaschinerie erhöht wird, kann die Zunahme acetylierter Lysinreste an Histonen einen direkten Einfluss auf Transkriptionsprozesse der Zelle besitzen aufweist (Imai et al. 2000, Michan und Sinclair 2007).

Somit ist es durchaus möglich, dass eine Hemmung der Deacetylase Sirt-1 auch zu einer Beeinflussung von Transkriptions- und Translationsprozessen führt und dass diese Beeinflussung ebenfalls eine wichtige Rolle für die Vermittlung der hemmenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale spielt (Abbildung 36).

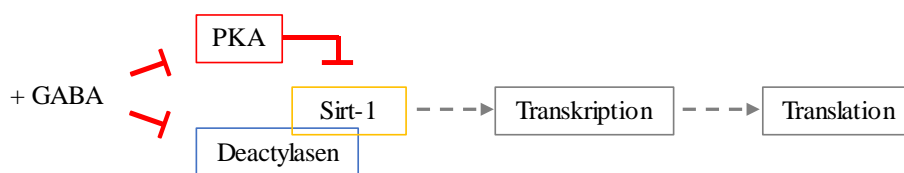
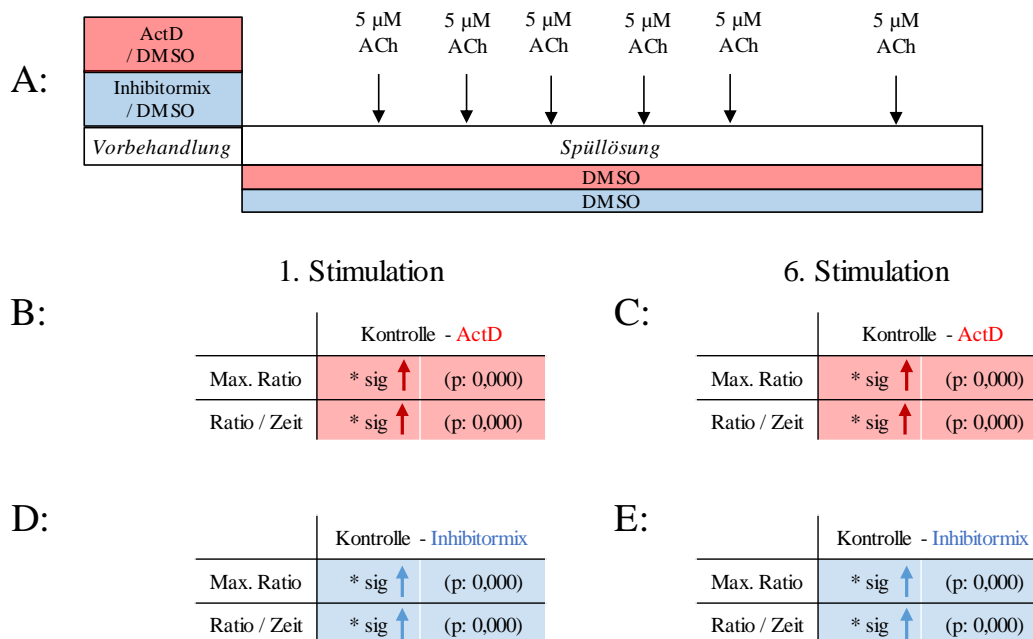


Abbildung 36: Einfluss des GABAergen Systems auf die Transkription und Translation der Zellen über eine Hemmung der Sirt-1 Aktivität

Um zu untersuchen, ob die hemmende Wirkung von TPM, welche in Anwesenheit von GABA nachweisbar ist, von Transkriptions- bzw. Translationsprozessen abhängt, wurde die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von Inhibitoren dieser beiden Prozesse untersucht. Als Inhibitor der Gentranskription wurde dazu Actinomycin D (ActD) verwendet, die Proteintranslation wurde mit einer Kombination aus den drei Translationsinhibitoren Emetin, Cycloheximid und Anisomycin (je 1  $\mu\text{M}$ , „Inhibitor-Mix“) gehemmt.

Zunächst wurde in einem Vorversuch ermittelt, ob die Vorbehandlung der Zellen mit ActD oder dem Inhibitor-Mix alleine bereits einen Einfluss auf den ACh-induzierten Calciumeinstrom besitzt, um einen möglichen Einfluss des Inhibitors von der Wirkung von TPM in Anwesenheit des Inhibitors unterscheiden zu können. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten vor und während der Messung mit ActD oder dem Inhibitor-Mix vorinkubiert und während der Messung nach dem Standard-Stimulationsprotokoll mit 5  $\mu\text{M}$  ACh stimuliert (Abbildung 37). Bei der Untersuchung des Einflusses von ActD auf ACh-induzierte Calciumsignale haben 87% der Zellen der Kontrollgruppe und 85% der Zellen der Behandlungsgruppe eine Reaktion auf die Stimulation mit ACh gezeigt, sodass sich kein Unterschied im Anteil reagierender Zellen andeutet. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl unabhängiger Experimente ( $n < 5$ ) in diesem Fall nicht durchgeführt. Bei der Untersuchung des Einflusses des Translations-Inhibitor-Mixes auf ACh-induzierte Calciumsignale lag kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 67%, Inhibitor-Mix 77%, T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p: 0,10$ ).



**Abbildung 37: Sowohl die Vorbehandlung der Zellen mit ActD, als auch mit dem Inhibitor mix, führt zu einer Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen. 2µM ActD oder der Inhibitor mix (Kontrolle jeweils: 0,06% DMSO) wurden jeweils 30 Minuten vor der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert.

**B, C:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (ActD, n = 387 Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,06% DMSO, n = 566 Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n= 6, ActD n= 4. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

**D, E:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (Inhibitor mix, n = 736 Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,06% DMSO, n = 578 Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n = 6, Inhibitor mix n = 7. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „sig.“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

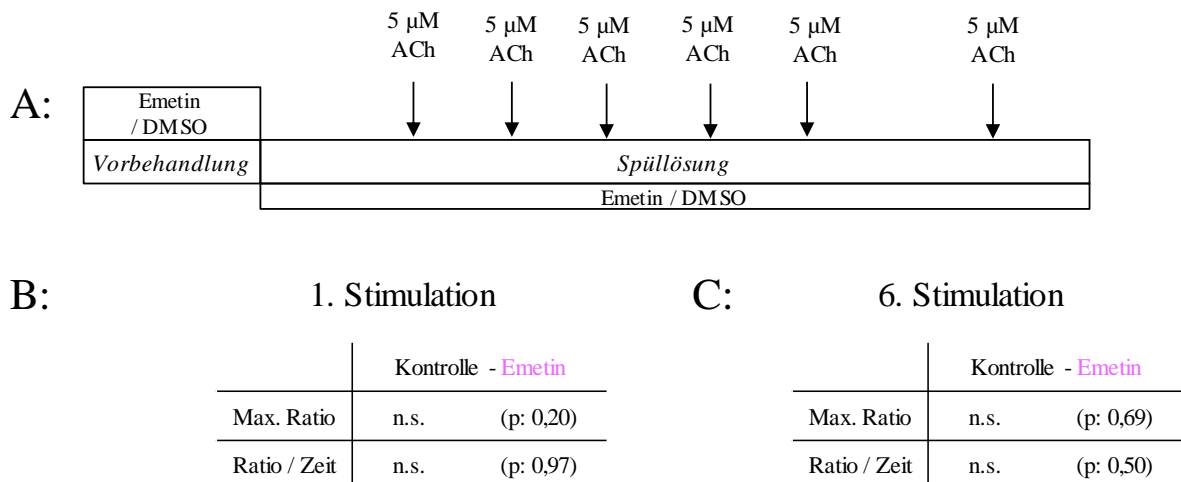
Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, führt sowohl die Vorbehandlung der Zellen mit ActD, als auch die Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor-Mix, zu einer Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale.

Dadurch, dass die Inkubation der Zellen mit ActD und dem Inhibitor mix alleine bereits so deutlich den ACh-induzierten Calciumstrom moduliert, ist es nicht möglich, mittels einer Kombination aus den Inhibitoren und TPM die Rolle der Transkription oder Translation für die hemmende TPM-Wirkung zu analysieren, sodass zur Beantwortung der Fragestellung ein alternativer Versuchsaufbau verwendet werden muss.



Für die Hemmung der Transkription stellt ActD den einzigen schnellwirksamen Transkriptioninhibitor dar, sodass auf keinen anderen Inhibitor zurückgegriffen werden kann (Bensaude, 2011). Für die Hemmung der Translation ist es jedoch möglich, nur einen der drei Translationsinhibitoren einzusetzen. Ein möglicher Grund für die starke Beeinflussung ACh-induzierter Calciumsignale durch die Kombination der verschiedenen Translationsinhibitoren kann darin bestehen, dass Anisomycin und CHX neben der Translation auch verschiedene Proteinkinasen, wie beispielsweise die p38 MAPK oder JNK beeinflussen (Shifrin und Anderson 1999, Sampieri et al. 2008, Oksvold et al. 2012). Im Gegensatz zu Anisomycin und CHX ist für Emetin bis heute keine solche „Nebenwirkung“ nachgewiesen, weshalb sich Emetin alleine möglicherweise deutlich besser eignet um eine spezifische Hemmung der Translation zu induzieren.

Daher wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob die Vorbehandlung der Zellen mit Emetin alleine einen Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten vor und während der Messung mit Emetin vorinkubiert und nach dem Standard-Stimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 38). Von den Zellen der Kontrollgruppe haben dabei 90% der Zellen eine Reaktion auf die Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh gezeigt, bei den Zellen der Behandlungsgruppe lag der Wert bei 96%, sodass sich kein Unterschied im Anteil reagierender Zellen zwischen den beiden Behandlungsgruppen andeutet. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl unabhängiger Experimente ( $n < 5$ ) in diesem Fall nicht durchgeführt.



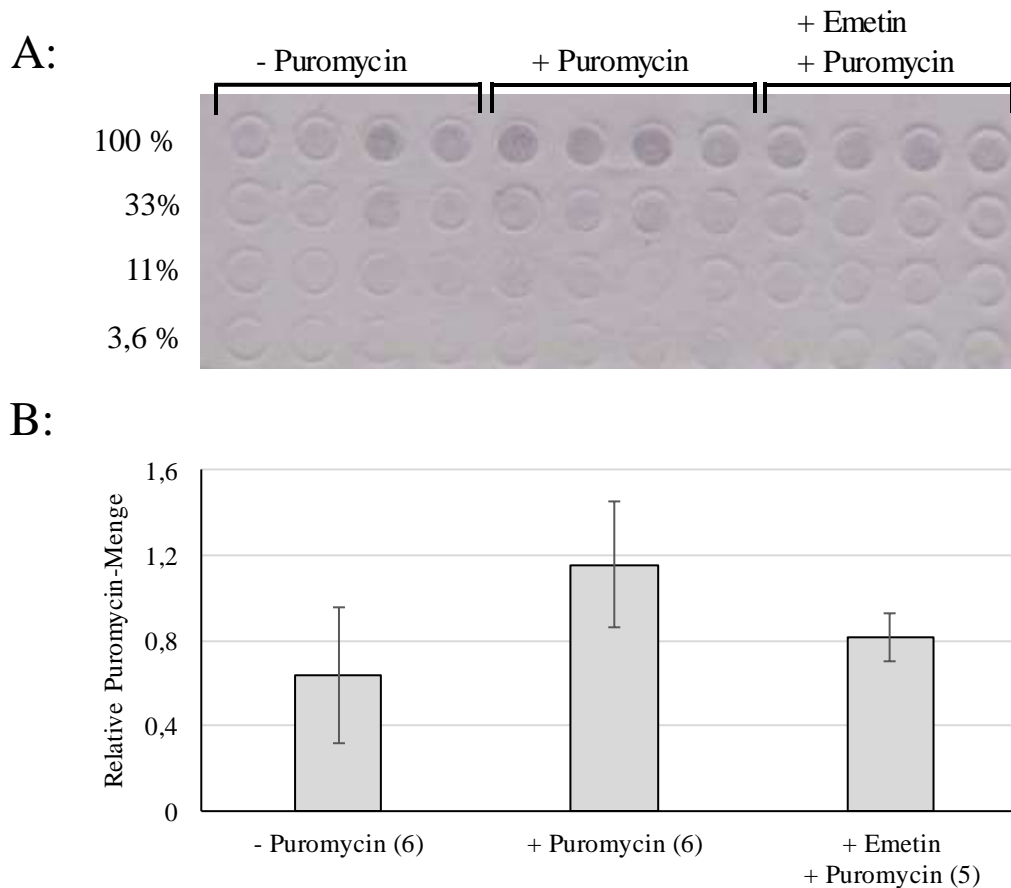
**Abbildung 38: Die Vorbehandlung der Zellen mit Emetin besitzt keinen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale**

**A:** Schematischer Ablauf der Messung. Emetin (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert.

**B, C:** Tabellarische Übersicht der statistischen Auswertung der Reaktionsparameter zwischen Zellen der Behandlungsgruppe (1  $\mu$ M Emetin, n = 315 Zellen) und Zellen der Kontrollgruppe (0,06% DMSO, n = 520 Zellen). Anzahl unabhängiger Experimente: jeweils n = 4. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Abbildung 38 fasst die Ergebnisse des Calcium-Imaging Experimentes zum Einfluss von 1  $\mu$ M Emetin auf den ACh-induzierten Calciumeinstrom zusammen. Es ist zu erkennen, dass die Vorbehandlung mit Emetin alleine keinen Einfluss auf die maximale Reaktionsstärke oder die Reaktionsgeschwindigkeit der beiden ausgewerteten Stimulationen besitzt. Aus diesem Grund kann Emetin als Translationsinhibitor zur Untersuchung der Fragestellung, ob die hemmende Wirkung von TPM translationsabhängig vorliegt, verwendet werden.

Vor der Untersuchung der Wirkung von TPM unter Einfluss von Emetin wurde zunächst noch untersucht, ob die Vorbehandlung mit 1  $\mu$ M Emetin auch tatsächlich eine nachweisbare Hemmung der Translation hervorruft. Dies wurde anhand eines Puromycin-Assays und einem anschließenden Dot-Blot untersucht. Beim Puromycin-Assay wird das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin gemeinsam mit den Zellen inkubiert. Während der Translation wird Puromycin in die neusynthetisierten Proteine eingebaut, wodurch die weitere Translation abbricht (Goodman und Hornberger 2013). Die Menge an eingebautem Puromycin dient als Maß für die Translationsaktivität der Zellen und kann mithilfe einer Antikörperfärbung im Dot-Blot quantifiziert werden.



**Abbildung 39: Einfluss von 1  $\mu$ M Emetin auf die Proteintranslation, nachgewiesen im Puromycin-Assay**

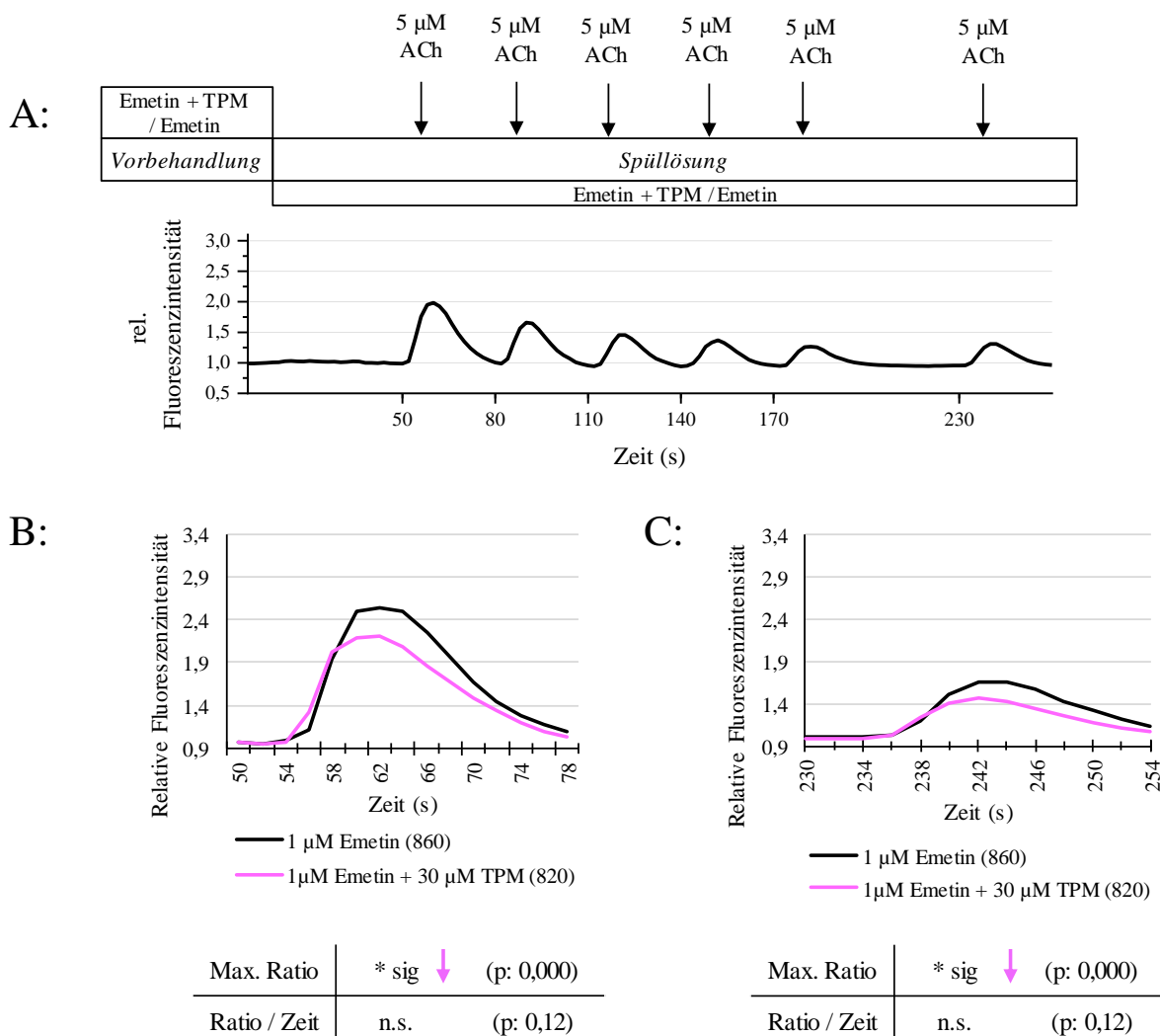
**A:** Beispielabbildung eines Dot-Blots mit drei verschiedenen aufgetragenen Zellhomogenaten. „- Puromycin“: Negativkontrolle, ohne Emetin, ohne Puromycin (0,09% DMSO) „+Puromycin“: Positivkontrolle, ohne Emetin, mit Puromycin (10 Min, 18  $\mu$ M). „+Emetin, + Puromycin“: 30 Minuten 1  $\mu$ M Emetin, 10 Minuten 18  $\mu$ M Puromycin. Verdünnungsstufen 100-3,6%. Detektion mit  $\alpha$ -Puromycin AK (1:10000) und BCIP-Färbung.

**B:** Auswertung der Signalstärke der Proben der jeweiligen Behandlung im Dot-Blot, Probenanzahl in Klammern. Die Signalstärke einer Probe errechnet sich aus dem Mittelwert der Signalstärke über die Verdünnungsstufen, normiert auf die Signalstärke aller Proben, die mit Puromycin behandelt wurden. Pro Behandlung wurde der Mittelwert der so errechneten Signalstärken aller Proben der Behandlungsgruppe gebildet. Es wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

Abbildung 39 fasst die Ergebnisse des Puromycin-Assays zusammen. Es ist zu erkennen, dass die Translationsaktivität der Zellen in Anwesenheit von Puromycin durch das deutliche Puromycin-Signal gut nachweisbar ist. Zudem kann anhand dieses Assays gezeigt werden, dass Emetin die Translationsaktivität der Zellen hemmt, da das Puromycin-Signal in Anwesenheit von Emetin + Puromycin schwächer ist, als in Abwesenheit von Emetin.

Da Emetin somit eine Hemmung der Proteintranslation in den Zellen bewirkt, ohne jedoch ACh-induzierte Calciumsignale zu beeinflussen, wird Emetin im Folgenden verwendet, um die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit der Translations-Inhibition zu untersuchen.

Dazu wurden die Zellen 30 Minuten vor und während der Messung mit einer Kombination aus TPM + Emetin inkubiert und nach dem Standardstimulationsprotokoll multiple mit ACh stimuliert (Abbildung 40). Dabei lag dabei kein signifikanter Unterschied im Anteil reagierender Zellen vor (Kontrolle: 85%, TSA+TPM 78%, T-Test, zweiseitig, ungepaart, p: 0,24).



**Abbildung 40: In Anwesenheit von Emetin zeigt TPM eine hemmende Wirkung auf die Reaktionsstärke ACh-induzierter Calciumsignale**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen und zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensitäten während der Messung. 1 µM Emetin + 30 µM TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 30 Minuten vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert. Die Stimulation erfolgte zu den auf der X-Achse dargestellten Zeitpunkten.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5 µM ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente jeweils n = 8. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, „n.s.“ = beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. p-Werte in Klammern. Detaillierte deskriptive Statistik und Rangstatistik siehe Anhang.

Es ist zu erkennen, dass in Anwesenheit des Translationsinhibitors Emetin eine hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale auftritt. Sowohl bei der ersten, als auch bei der letzten Stimulation liegt dabei eine signifikante Reduktion der Reaktionsstärke (max. Ratio) vor, eine Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch bei keiner der beiden Stimulationen nachweisbar.

Die Wirkung von TPM in Anwesenheit von Emetin stimmt somit vollständig mit der Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA überein, woraus geschlossen werden kann, dass eine Hemmung der Translation für die Ausbildung der hemmenden Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA eine wichtige Rolle spielt.

#### **4.5 TPM beeinflusst die Aktivität von Sirt-1 in SHSY-5Y Zellen**

In den vorangegangenen Calcium-Imaging Experimenten konnte gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale nicht nur in Anwesenheit von GABA, sondern auch in Anwesenheit des Translationsinhibitors Emetin und des Sirt-1 Inhibitors Inauhzin nachweisbar ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die hemmende TPM-Wirkung in Anwesenheit von Inauhzin besonders stark ausgeprägt ist und noch über die hemmende Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA und Emetin hinausgeht. Aus diesem Grund ist es möglich, dass die Aktivität der Deacetylase Sirt-1 eine zentrale Rolle bei Ausbildung der Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale spielt. Deshalb soll der Zusammenhang zwischen der TPM-Wirkung und der Aktivität von Sirt-1 in den folgenden Experimenten noch etwas genauer charakterisiert werden.

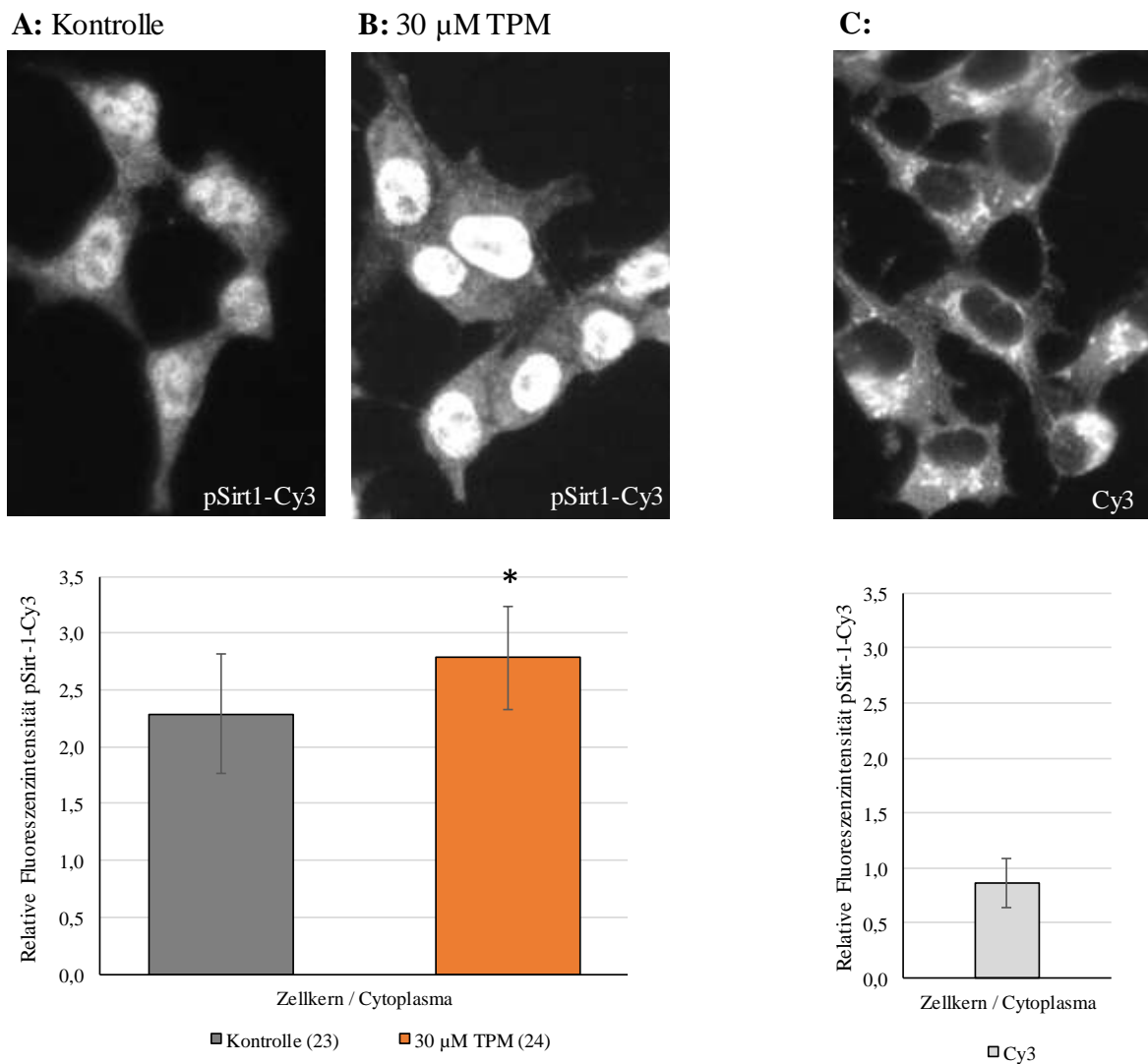
##### **4.5.1 Die Vorbehandlung der Zellen mit TPM induziert möglicherweise eine Zunahme der Sirt-1 Aktivität**

Das Ergebnis, dass TPM in Anwesenheit des Sirt-1 Inhibitors Inauhzin eine hemmende Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt, gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Aktivität von Sirt-1 einen starken Einfluss auf die Wirkung von TPM besitzt. Dabei ist es möglich, dass die Aktivität von Sirt-1 nicht nur bei der Ausbildung der hemmenden, sondern auch bei der Ausbildung der stimulierenden Wirkung von TPM eine Rolle spielt. Um diese Hypothese zu überprüfen, soll im folgenden Versuch ermittelt werden, ob ein Einfluss von TPM auf die Aktivität von Sirt-1 nachweisbar ist.

Verschiedene Arbeiten geben erste Hinweise darauf, dass die Aktivität von Sirt-1 nicht nur durch das Vorliegen des Cofaktors NAD<sup>+</sup>, sondern auch über die Phosphorylierung von Sirt-1 reguliert werden kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Sirt-1 zur Aktivierung dieser Deacetylase führt (Gerhart-Hines 2011, Zhang et al. 2020, Sasaki et al. 2008, Nasrin et al. 2009). Aus

diesem Grund kann eine Veränderung im Vorliegen phosphorylierter Sirt-1 (pSirt-1) einen Hinweis darauf geben, ob die Aktivität von Sirt-1 beeinflusst ist.

Deshalb wurde im folgenden Versuch ermittelt, ob die Vorbehandlung der Zellen mit TPM eine Veränderung im Vorliegen von pSirt-1 hervorruft. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten mit TPM vorbehandelt und pSirt-1 mit spezifischen Antikörpern in einer immunhistologischen Färbung detektiert (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Die Vorbehandlung mit TPM führt zu einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern**

**A, B: Oben:** Beispielaufnahmen der histologischen Färbung der Zellen, welche mit Hilfe des Cy3-gekoppelten Antikörpers pSirt-1 (1:100) gefärbt wurden. Die Färbung erfolgte nach 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen mit 30  $\mu$ M TPM (B) (Kontrolle (A): 0,08% DMSO). 400x Vergrößerung, 800 ms Belichtung, kein Binning. **Unten:** Ergebnis der histologischen Färbung als Verhältnis pSirt-1-Cy3 zwischen Zellkern und Cytoplasma. Anzahl unabhängiger Experimente: n = 4, p = 0,0012 (T-Test, zweiseitig, ungepaart).

**C: Oben:** Beispielaufnahmen der histologischen Färbung der Zellen, welche als Negativkontrolle der Fluoreszenzfärbung dienen und nur mit Hilfe des Cy3-gekoppelten anti-rabbit Antikörpers pSirt-1 (1:1000) gefärbt wurden. **Unten:** Ergebnis der histologischen Färbung als Verhältnis pSirt-1-Cy3 zwischen Zellkern und Cytoplasma.

Wie in Abbildung 41, A+B zu erkennen ist, führt die Vorbehandlung der Zellen mit 30  $\mu$ M TPM vor allem im Zellkern der Zellen zu einer Zunahme pSirt-1. Um diese Zunahme quantifizieren zu können, wurde das Verhältnis der pSirt-1 Färbung zwischen Cytoplasma und Zellkern ausgewertet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit TPM zu einer signifikanten relativen Zunahme von pSirt-1 im Verhältnis zwischen Zellkern zu Cytoplasma führt (Abbildung 41).

Um zu zeigen, dass die hier nachgewiesene pSirt-1 Färbung spezifisch ist, wurde zudem eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die Zellen nur mit dem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper gefärbt wurden (Abbildung 41, C). Dabei ist zu erkennen, dass eine geringe unspezifische Färbung der Zellen auftritt, welche überwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, sodass sich ein Verhältnis Zellkern / Cytoplasma bei dieser Färbung  $< 1$  ergibt. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der 3D-Struktur der Zellen immer noch eine gewisse Überlagerung der Cytoplasma-Färbung im Bereich der Zellkerne auftreten kann, da der Zellkern von Cytoplasma eingeschlossen ist.

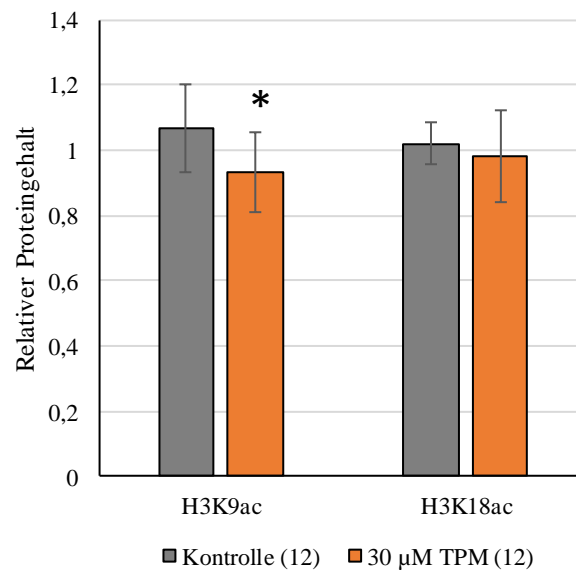
Da die Phosphorylierung von Sirt-1 mit einer Aktivierung dieser Deacetylase in Verbindung stehen kann, gibt das Ergebnis, dass TPM zu einer relativen Zunahme von pSirt-1 im Zellkern führt, einen ersten Hinweis darauf, dass TPM möglicherweise die Aktivität von Sirt-1 steigert (Gerhart-Hines 2011, Zhang et al. 2020, Sasaki et al. 2008, Nasrin et al. 2009). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivität von Sirt-1 nicht nur eine Rolle bei der Vermittlung der hemmenden TPM-Wirkung in Anwesenheit von GABA spielt, sondern dass möglicherweise auch die Anwesenheit von TPM selbst einen Einfluss auf die Sirt-1 Aktivität besitzt.

Da die TPM-induzierte Zunahme von pSirt-1 im Zellkern möglicherweise die Grundlage der stimulierenden TPM-Wirkung auf die ACh-induzierten Calciumsignale darstellt, soll nun ermittelt werden, ob sich auch weitere Hinweise darauf finden lassen, dass TPM die Aktivität von Sirt-1 beeinflusst.

Eine oft angewendete Methode, um die Aktivität von Sirt-1 zu untersuchen, stellt die Untersuchung von Sirt-1 Substraten dar. Dabei kann beispielsweise eine gesteigerte Sirt-1 Deacetylase-Aktivität über das reduzierte Vorliegen von spezifischen Proteinacetylierungen nachgewiesen werden. Da ein vermehrtes Vorliegen von pSirt-1 vor allem im Zellkern nachweisbar war, wird im Folgenden nun die Acetylierung von Sirt-1 spezifischen Zielproteinen im Zellkern genauer untersucht.

Im Zellkern besteht die Funktion von Sirt-1 vor allem darin, Histonproteine zu deacetylieren und so die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie der Zellen zu modulieren (Imai et al. 2000, Michan und Sinclair 2009). Dabei ist bekannt, dass die Deacetylase Sirt-1 unter anderem die Deacetylierung des Lysinrestes 9 am Histon H3 (H3K9ac) katalysiert (Michan und Sinclair 2009, Imai et al. 2000). Aus diesem Grund wird im Folgenden ermittelt, ob TPM einen Einfluss auf das Vorliegen der Sirt-1 spezifischen Histonacetylierung H3K9ac besitzt. Dazu werden die Zellen für 30 Minuten mit

TPM vorbehandelt und anschließend wird das Vorliegen von H3K9ac mit Hilfe eines ELISA-Assays ermittelt (Abbildung 43).



**Abbildung 42: Die Vorbehandlung mit 30 µM TPM reduziert die Menge an H3K9ac**

Zur Durchführung des ELISA-Assays wurden die Zellen für 30 Minuten mit 30 µM TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) vorbehandelt. Anschließend wurde die relative Proteinmenge der Histonmodifikationen H3K9ac und H3K18ac detektiert. Anzahl unabhängiger Proben in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: 2. Statistik: T-Test, zweiseitig, ungepaart,  $p = 0,02$ .

Anhand dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit 30 µM TPM zu einer Reduktion der Sirt-1 spezifischen Histonmodifikation H3K9ac führt. Eine weitere Histon-Acetylierung (H3K18ac), welche keine spezifische Zielstruktur von Sirt-1 darstellt und dadurch als interne Kontrolle dient, wird durch TPM nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis gibt einen weiteren klaren Hinweis darauf, dass die Vorbehandlung der Zellen mit TPM möglicherweise die Aktivität von Sirt-1 steigert.

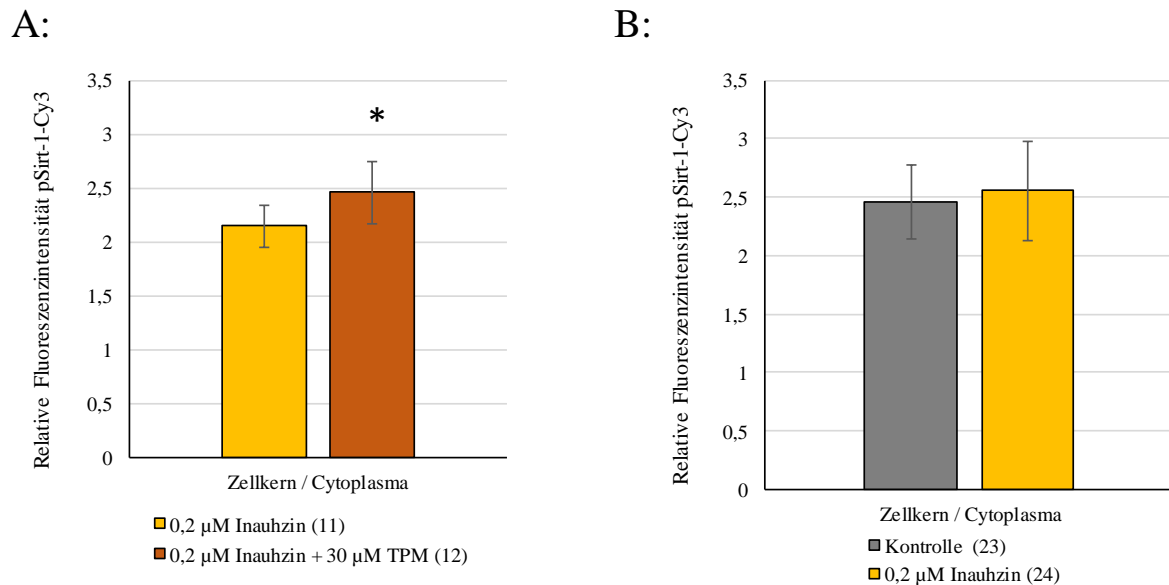
#### **4.5.2 Inauhzin beeinflusst die TPM-induzierte Zunahme von pSirt-1 im Zellkern nicht**

In den vorherigen Versuchen konnten durch die Zunahme von pSirt-1 im Zellkern der SHSY-5Y Zellen und die Reduktion der Sirt-1 spezifischen Zielstruktur H3K9ac klare Hinweise darauf gefunden werden, dass TPM eine Zunahme der Sirt-1 Aktivität der SHSY-5Y Zellen hervorruft. Diese TPM-induzierte Beeinflussung der Sirt-1 Aktivität könnte dabei die molekulare Grundlage der stimulierenden Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale darstellen.

Deshalb soll nun im folgenden Versuch ermittelt werden, ob auch die hemmende Wirkung von TPM in Anwesenheit von Inauhzin mit einem veränderten Vorliegen von pSirt-1 im Zusammenhang steht. Dazu



wurde das Vorliegen von pSirt-1 anhand einer immunhistologischen Färbung nach einer 30-minütigen Vorbehandlung der Zellen mit TPM + Inauhzin untersucht (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Die Vorbehandlung mit TPM + Inauhzin führt ebenfalls zu einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern**

**A:** Ergebnis der histologischen Färbung als Verhältnis pSirt-1-Cy3 zwischen Zellkern und Cytoplasma. Die Färbung erfolgte nach 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen mit 0,2 µM Inauhzin + 30 µM TPM (Kontrolle: 0,08% DMSO). Anzahl unabhängiger Experimente: n = 2, p = 0,0061 (T-Test, zweiseitig, ungepaart).

**B:** Ergebnis der histologischen Färbung als Verhältnis pSirt-1-Cy3 zwischen Zellkern und Cytoplasma. Die Färbung erfolgte nach 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen mit 0,2 µM Inauhzin (Kontrolle: 0,08% DMSO). Anzahl unabhängiger Experimente: n = 4, p = 0,38 (T-Test, zweiseitig, ungepaart).

Es konnte gezeigt werden, dass auch die Vorbehandlung der Zellen mit Inauhzin + TPM eine relative Zunahme von pSirt-1 im Zellkern hervorruft (Abbildung 43, A). Da durch die Vorbehandlung der Zellen mit Inauhzin alleine keine Veränderung im Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern auftritt (Abbildung 43, B), ist die Zunahme von pSirt-1 dabei alleinig auf die Wirkung von TPM zurückzuführen.

Somit führt TPM unabhängig vom Vorliegen des Sirt-1 Inhibitors dazu, dass mehr pSirt-1 im Zellkern der SHSY-5Y Zellen nachweisbar ist. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass eine durch TPM-induzierte Zunahme von pSirt-1 im Zellkern und die Hemmung der Sirt-1 Aktivität durch Inauhzin möglicherweise zwei voneinander unabhängige Prozesse darstellen, über die Sirt-1 reguliert werden kann.

## 5 Diskussion

Über die Wirkung von TPM auf die neuronale Signaltransmission ist aus früheren Forschungsarbeiten bisher bekannt, dass TPM einen hemmenden Einfluss auf das cholinerge Plateaupotential, auf die erregende Signaltransmission über glutamaterge AMPA- und Kainat-Rezeptoren, sowie über spannungsgesteuerte Natrium- und Calciumkanäle besitzt (Gibbs et al. 2000, Palmieri et al. 2000, Ängehagen et al. 2004, Curia et al. 2004, Poulsen et al. 2004, Ängehagen et al. 2005, Kuzmiski et al. 2005, D'Antuono et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TPM die hemmende, GABAerge Signaltransmission in Abhängigkeit vom Aufbau der GABA-Rezeptoren verstärken kann und eine potenzierende Wirkung auf GABA-induzierte Chloridströme besitzt (Gordey et al. 2000, Simeone et al. 2006, White et al. 1997, White et al. 2000). Diese bisher bekannten Wirkungen von TPM sind in Abbildung 44, A schematisch zusammengefasst.

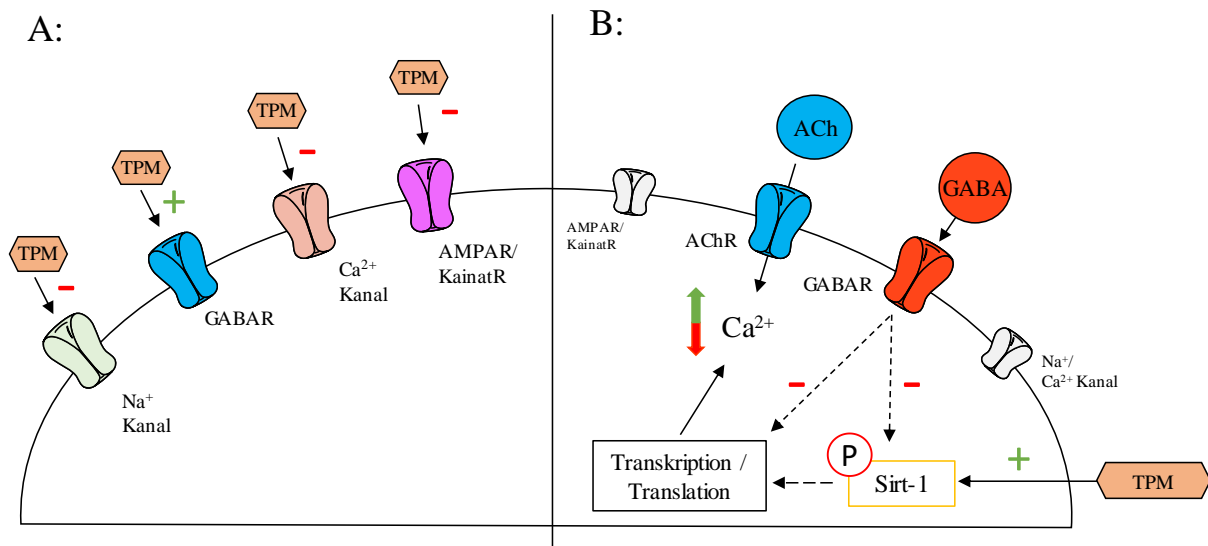
Trotz dieser umfangreichen Forschungsarbeiten konnte der genaue molekulare Mechanismus, welcher der Wirkung von TPM auf all die genannten Systeme zu Grunde liegt, bis heute allerdings noch nicht aufgeklärt werden. Um ein besseres Verständnis über die Grundlage der TPM-Wirkung zu erhalten, wurde im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nun die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA an der humanen Neuroblastozelllinie SHSY-5Y untersucht. Dabei konnten drei zentrale und bisher noch unbekannte Erkenntnisse gewonnen werden:

- 1) TPM verstärkt und beschleunigt ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA,
- 2) in Anwesenheit von GABA liegt eine hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale vor,
- 3) sowohl die verstärkende, als auch die hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale steht mit der Aktivität der Proteindeacetylase Sirt-1 – und darüber möglicherweise auch mit einer beeinflussten Gentranskription/Proteintranslation der Zellen - in Verbindung.

Aus diesen Kernergebnissen lässt sich eine neue Hypothese zum Mechanismus der TPM-Wirkung formulieren, welche in Abbildung 44, B schematisch dargestellt ist:

Die Vorbehandlung der Zellen mit TPM führt zu einer Aktivierung der Deacetylase Sirt-1, worauf das vermehrte Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern und die Reduktion der Sirt-1 spezifischen Histonacetylierung H3K9ac unter Einfluss von TPM einen klaren Hinweis geben. Die durch TPM beeinflusste Sirt-1 Aktivität steht, möglicherweise durch beeinflusste Transkriptions- und Translationsprozesse, mit der Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale in Verbindung. Tritt zusätzlich zur TPM-induzierten Modulation der Sirt-1 Aktivität auch eine GABA-

induzierte Beeinflussung von Sirt-1 und/oder der Proteintranslation in den Zellen auf, führt dies zur hemmenden Wirkung von TPM auf die ACh-induzierten Calciumsignale (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung der bisher angenommenen Wirkungsweise von TPM (A) und der neuen Hypothese zum Wirkmechanismus (B)

**A:** In früheren Forschungsarbeiten wurde der Einfluss von TPM auf verschiedene Rezeptoren und Ionenkanäle jeweils getrennt voneinander untersucht, wobei die dargestellten Effekte nachweisbar waren.

**B:** Die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit lassen eine neue Hypothese zur Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale zu, bei der sowohl die nachgewiesene stimulierende, als auch die hemmende TPM-Wirkung in Verbindung mit der Aktivität der Deacetylase Sirt-1 stehen.

In den folgenden Abschnitten soll nun die Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse erklärt werden und in Bezug zum aktuellen Forschungsstand gesetzt werden.

### 5.1 TPM beeinflusst ACh-induzierte Calciumsignale

Das Ergebnis, dass TPM auch Acetylcholin-induzierte Calciumsignale beeinflusst, stellt eine wichtige Erweiterung des Kenntnisstandes über die Wirkungseigenschaften von TPM dar, da über die Wirkung von TPM auf das cholinerge System bis heute noch kaum etwas bekannt ist.

Bisher wurde über die Wirkung von TPM auf die cholinerge Signaltransmission nur gezeigt, dass TPM die Ausbildung des cholinergen Plateaupotenzials hemmt (Palmieri et al. 2000, Kuzmiski et al. 2005, D'Antuono et al. 2007). Das cholinerge Plateaupotenzial (PP) stellt ein sehr spezielles Phänomen dar, welches eine verlängerte Depolarisation der Zellen verursacht und tritt auf, wenn Zellen in Anwesenheit muskariner Agonisten, wie beispielsweise Carbachol, elektrisch depolarisiert werden (Kuzmiski et al. 2005). Die Ausbildung des PP basiert auf der Aktivierung spannungabhängiger Calciumkanäle im Zusammenspiel mit der Aktivierung muskariner M1 und M3 Rezeptoren. Daraus resultiert über eine

Aktivierung von Guanylatyclasen (GC) ein Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (*cyclic guanosine monophosphate*), was zur Aktivierung von CNG-Kanälen (*Cyclic nucleotide-gated ion channels*) führt. Dies stellt dann die Grundlage für die verlängerte Depolarisation dar (Kuzmiski et al. 2005). Verschiedene Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass die Zugabe von TPM die Ausbildung dieses PP hemmt (Palmieri et al. 2000, Kuzmiski et al. 2005, D'Antuono et al. 2007). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Wirkung von TPM auf das PP nicht durch eine Blockade muskariner AChR, sondern vielmehr durch die Hemmung spannungsabhängiger R-Typ-Calciumkanäle vermittelt wird (Kuzmiski et al. 2005).

### 5.1.1 TPM beeinflusst möglicherweise die Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen

Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten konnte im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nun erstmals gezeigt werden, dass TPM ACh-induzierte Calciumsignale verstärkt und beschleunigt (Abbildung 25).

ACh-induzierte Calciumsignale an Neuronen entstehen durch die Bindung von ACh an nikotinische (nAChR) und muskarine (mAChR) Acetylcholinrezeptoren und einem dadurch induzierten Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum und einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dabei sind nAChR und mAChR unterschiedlich an diese beiden Calciumquellen gekoppelt. Die Aktivierung nikotinischer AChR führt zunächst zu einem initialen Einstrom von Natrium und Calcium durch den Rezeptor. Die dadurch ausgelöste Depolarisation der Zellen führt zu Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle (*voltage gated calcium channels*, VGCC), wodurch ein starker Calciumeinstrom in die Zelle ausgelöst wird (Dajas-Bailador 2002). Dieser Calciumeinstrom durch VGCC's macht den größten Anteil des intrazellulären Calciumanstiegs nach Aktivierung von nAChR an SHSY-5Y Zellen aus (Dajas-Bailador 2002). Zu einem geringeren Teil löst die Aktivierung nAChR allerdings auch einen sogenannten „*calcium-induced calcium release*“ (CICR) aus, bei dem durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zusätzlich auch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Calciumspeichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), ausgelöst wird (Dajas-Bailador 2002). Im Gegensatz zur Aktivierung von nAChR führt die Aktivierung von mAChR zu keinem Einstrom von Calcium über den Rezeptor selbst, sondern zu einer Aktivierung G-Protein-gekoppelter Signalkaskaden, in deren Folge ebenfalls eine Freisetzung von Calcium aus dem ER hervorgerufen wird. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Aktivierung mAChR zu einem gewissen Teil auch einen Einstrom von Calcium durch VGCC hervorrufen kann (Bannister et al. 2004, Tai et al. 2006).

Durch die hier durchgeführte Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale auf einer Beeinflussung nikotinischer und muskariner AChR beruhen muss, da die Wirkung von TPM auf Nikotin-induzierte Calciumsignale nicht vollständig mit der TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale übereinstimmt (Abbildung 26). Der größte Unterschied

liegt dabei in der TPM-Wirkung auf die induzierten Calciumsignale der jeweils letzten applizierten ACh- oder Nikotin-Stimulation. Während die Vorbehandlung der Zellen mit TPM auch bei der letzten applizierten ACh-Stimulation eine Verstärkung und Beschleunigung der induzierten Calciumsignale auslöst, liegt bei der Nikotin-Stimulation nur eine Verstärkung, aber keine Beschleunigung der Calciumsignale vor. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine stabile Beeinflussung der ACh-induzierten Calciumsignale aller applizierten Stimulationen durch TPM nur dann auftritt, wenn neben nAChR auch mAChR aktiviert werden und dass die Wirkung von TPM somit auf einer Beeinflussung beider AChR-Klassen beruht. Der Umstand, dass dieser Unterschied gar nicht erst aufgefallen wäre, wenn die Zellen nur einmalig mit ACh stimuliert worden wären, zeigt, dass der gewählte Versuchsaufbau zur multiplen Stimulation sehr gut geeignet ist um eine umfassende und detaillierte Analyse der TPM-Wirkung zu ermöglichen.

Ein möglicher Mechanismus, über den TPM sowohl die nAChR- als auch die mAChR-vermittelten Calciumsignale beeinflussen könnte, wäre die Modulation der AChR- und/oder Ionenkanal-Ausstattung der Zellen. So ist beispielsweise bekannt, dass der Aufbau von nAChR aus den verschiedenen  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten einen starken Einfluss auf die Signaltransmission über die AChR besitzt (Bertrand S. und Bertrand D. 2004, Albuquerque et al. 2009). Homomere  $\alpha 7$ -nAChR weisen beispielsweise eine deutlich höhere Permeabilität für Calciumionen auf als andere nAChR-Subtypen und besitzen zudem auch eine deutlich schnellere Öffnungs- und Desensibilisierungskinetik (Chavez-Noriega et al. 1997, Albuquerque et al. 2009). Werden  $\alpha 7$ -Untereinheiten gemeinsam mit anderen nAChR-Untereinheiten exprimiert, so beeinflusst und verändert das die Eigenschaften dieser nAChR deutlich (Criado et al. 2012).

Darüber hinaus exprimieren Neurone beispielsweise auch unterschiedliche Subtypen spannungsabhängiger Calciumkanäle (VGCC's), welche sich ebenfalls in Bezug auf ihre Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden und deren verändertes Vorliegen somit auch für eine Modulation ACh-induzierter Calciumsignale verantwortlich sein können (Gurkoff et al. 2013). So besitzen beispielsweise R-Typ VGCC's ein Aktivierungspotenzial von -25 bis -40 mV auf und inaktivieren innerhalb von 50-100 ms. Im Vergleich dazu sind T-Typ VGCC's bereits bei ca. -70 mV aktivierbar und zeigen eine schnellere Inaktivierungsgeschwindigkeit von nur 10-70 ms (Gurkoff et al. 2013).

Die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften verschiedener nAChR- und VGCC-Subtypen zeigt, dass eine Beeinflussung der Expression solcher Rezeptoren und/oder Ionenkanäle in Folge der Vorbehandlung der Zellen mit TPM durchaus als möglicher Mechanismus in Frage kommt, über den TPM die ACh-induzierten Calciumsignale in den verwendeten SHSY-5Y Zellen beeinflusst.

## **5.2 Die Wirkung von TPM unterscheidet sich in An- und Abwesenheit von GABA**

Zusätzlich zur potenzierenden TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in Abwesenheit von GABA, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass TPM in Anwesenheit von GABA einen hemmenden Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt (Abbildung 28). Dieses Ergebnis stellt einen ganz neuen Aspekt der TPM-Wirkung dar, der in dieser Form bisher noch nicht untersucht wurde.

In früheren Forschungsarbeiten wurde bisher nur die Wirkung von TPM auf das GABAerge System untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass TPM GABA-induzierte (Chlorid-) Ströme potenziert und dass diese Wirkung abhängig davon ist, aus welchen Untereinheiten die jeweiligen GABA-Rezeptoren aufgebaut sind (Gordey et al. 2000, Simeone et al. 2006, White et al. 1997, White et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde in der hier durchgeführten Arbeit nicht die Wirkung von TPM auf das GABAerge System untersucht, sondern es wurde ermittelt, welchen Einfluss die Aktivierung des GABAergen Systems auf die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt.

### **5.2.1 Die Wirkung von GABA an den SHSY-5Y wird möglicherweise über GABA<sub>B</sub> Rezeptoren vermittelt**

Bei der Untersuchung der TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA konnte zunächst gezeigt werden, dass die Anwesenheit von GABA selbst keinen starken Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale besitzt (Abbildung 27). Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass die verwendeten SHSY-5Y Zellen möglicherweise kein ionotropes GABAerges System besitzen.

Wie das cholinerge System besteht auch das GABAerge System von Neuronen sowohl aus ionotropen, GABA<sub>A</sub>-, als auch auf metabotropen, GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Chebib und Johnston 1999). Während die Aktivierung von GABA<sub>A</sub> Rezeptoren eine schnelle Hyperpolarisation und Hemmung der Neurone über den Einstrom von Chloridionen durch den Rezeptor hervorruft, führt die Aktivierung metabotroper GABA<sub>B</sub> Rezeptoren zur Aktivierung von G-Protein gekoppelten Signalkaskaden und zu einer langsameren Hemmung der Neurone (Chebib und Johnston 1999).

Expressionsanalysen, die in früheren Forschungsarbeiten durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass die verwendeten SHSY-5Y Zellen sowohl Untereinheiten ionotroper, als auch metabotroper GABA Rezeptoren aufweisen (Kurecka et al. 2013, Xing et al. 2019). Eine funktionelle Analyse des GABAergen Systems über die Analyse des Einflusses von GABA auf ACh-induzierte Calciumsignale, wie sie im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wurde in dieser Form in früheren Arbeiten an SHSY-5Y allerdings noch nicht durchgeführt.

Um die hier erhaltenen Ergebnisse dennoch einordnen zu können, lässt sich der hier nachgewiesene Einfluss von GABA auf ACh-induzierte Calciumsignale mit dem Einfluss von GABA auf ACh-

induzierte Calciumsignale an anderen neuronalen Modellsystemen vergleichen. Betrachtet werden kann dabei beispielsweise der Einfluss von GABA auf ACh-induzierte Calciumsignale an Kenyonzellen der Honigbiene. Wie alle Kenyonzellen der Insekten weisen auch diese ein funktionelles cholinerges und ein funktionelles GABAerges System auf, welches sowohl aus ionotropen, als auch aus metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren besteht (Cayre et al. 1999). An diesen Neuronen konnte gezeigt werden, dass die gepaarte Stimulation von GABA + ACh zu einer starken Dämpfung ACh-induzierter Calciumsignale führt (Raccuglia und Mueller 2014). Da diese Dämpfung ACh-induzierter Calciumsignale auch mit dem GABA<sub>A</sub>-Agonisten Muscimol, nicht aber mit dem GABA<sub>B</sub>-Agonisten 3-APMPA nachweisbar war, beruht die GABA-induzierte Hemmung ACh-induzierter Calciumsignale an diesen Neuronen vornehmlich auf der Aktivierung ionotroper GABA-Rezeptoren (Raccuglia und Mueller 2014).

Da ein vergleichbarer Einfluss von GABA auf die ACh-induzierten Calciumsignale an den hier gemessenen SHSY-5Y Zellen nicht nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die SHSY-5Y Zellen möglicherweise kein funktionelles ionotropes GABAerges System aufweisen und dass die Beeinflussung der SHSY-5Y Zellen durch GABA somit auf einer Aktivierung metabotroper GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren beruht.

### **5.2.2 Eine GABA-induzierte Modulation der Translation als Grundlage der hemmenden TPM-Wirkung**

Das im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit erhaltene Ergebnis, dass sich die Wirkung von TPM in Anwesenheit von GABA von der Wirkung in Abwesenheit von GABA unterscheidet, lässt sich am ehesten damit erklären, dass durch die Anwesenheit von GABA zentrale intrinsische Prozesse der gemessenen Neurone beeinflusst werden und dies dann die Grundlage für die Ausbildung der hemmenden TPM-Wirkung darstellt.

Bei der detaillierten Analyse, welche intrinsischen Prozesse möglicherweise durch GABA moduliert werden und darüber die Grundlage für die Ausbildung der hemmenden TPM Wirkung darstellen, konnte gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der Translation einen möglichen Mechanismus darstellt, über den GABA die gemessenen Neurone beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass TPM in Anwesenheit des Translationsinhibitors Emetin die gleiche hemmende Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzt, wie in Anwesenheit von GABA nachweisbar ist (Abbildung 40).

Eine beeinflusste Translation der Zellen durch GABA könnte die Zellphysiologie und intrinsische Erregbarkeit der Zellen so beeinflussen, dass TPM an diesen Zellen keine stimulierende, sondern eine hemmende Wirkung besitzt.

Ein direkter Nachweis, dass GABA die Proteintranslation in Neuronen beeinflusst und darüber auch die Wirkung neuromodulativer Wirkstoffe wie TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale moduliert, konnte in früheren Forschungsarbeiten in dieser Form noch nicht erbracht werden. Allerdings finden sich in der Literatur einige Hinweise darauf, dass eine GABA-induzierte Beeinflussung der Translation grundsätzlich möglich sein kann. Zum einen konnte gezeigt werden, dass bestimmten Transkriptionsfaktoren, wie ATF4/CREB2 und CHOP direkt mit GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren interagieren können (Terunuma 2018). Auch wenn die physiologische Bedeutung dieser Interaktion noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, konnte zumindest gezeigt werden, dass die Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren die Translokation von ATF4/CREB2 in und aus dem Zellkern beeinflusst (Terunuma 2018). Auf diese Weise könnte die Aktivierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren möglicherweise mit einer veränderten Transkription in Verbindung stehen und darüber möglicherweise auch die Translation beeinflussen. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die Inkubation hippocampaler Neurone mit dem GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Agonisten Baclofen zu einer Beeinflussung des Transkriptom dieser Zellen führt (Ghorbel et al. 2005). Darüber hinaus konnte auch nachgewiesen werden, dass die Prozesse, die der homöostatischen Plastizität hippocampaler Synapsen zugrunde liegen, translationsabhängig sind und das Proteom der beteiligten Neurone verändern (Schanzenbächer et al. 2016). Somit ist es durchaus wahrscheinlich, dass auch eine Aktivierung des GABAergen Systems über einen Zeitraum von 30 Minuten, wie es im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, translationsabhängige Veränderungen der Neurone hervorrufen kann.

Eine umfassende Analyse, ob und in welcher Form GABA an den hier verwendeten SHSY-5Y Zellen eine translationsabhängige Veränderung des Proteoms hervorruft, könnte über die Anwendung von Silcat (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) oder Boncat (*bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging*)-Verfahren durchgeführt werden (Schanzenbächer et al. 2016, Stone et al. 2017). Allerdings sind diese Verfahren sehr zeitaufwändig, da sie eine umfassende bioinformatische Analyse der erhaltenen Datensätze voraussetzen, sodass eine solche Analyse in eigenständigen zukünftigen Forschungsarbeiten untersucht werden müssten.

### **5.3 Sirt-1 spielt sowohl bei der hemmenden, als auch bei der stimulierenden TPM-Wirkung zentrale Rolle**

Zusätzlich zum Nachweis, dass die Anwesenheit des Translationsinhibitors Emetin eine hemmende Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale hervorruft, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit auch gezeigt werden, dass eine hemmende TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit des Sirt-1 Inhibitors Inauhzin auftritt (Abbildung 35).



Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aktivität der Deacetylase Sirt-1 womöglich eine zentrale Rolle bei Vermittlung und Ausbildung der hemmenden TPM-Wirkung besitzt. Im Gegensatz zur Translation, die ja einen breitgefächerten Prozess darstellt, liegt durch die Identifizierung von Sirt-1 somit eine konkrete Zielstruktur vor, deren Rolle für die Ausprägung der TPM-Wirkung gezielt untersucht werden kann.

Über den Zusammenhang der TPM-Wirkung mit der Aktivität von Deacetylasen ist aus früheren Forschungsarbeiten bisher nur bekannt ist, dass TPM eine Hyperacetylierung des Histons H4 in HeLa-Zellen hervorrufen kann (Eyal et al. 2004). Somit stellt das hier erhaltene Ergebnis, dass die Wirkung von TPM möglicherweise mit der Aktivität der Deacetylase Sirt-1 in Verbindung steht, einen vollkommen neuen und sehr vielversprechenden Ansatz zur Aufklärung der TPM-Wirkung dar.

### **5.3.1 Sirt-1 könnte eine GABA-induzierte Beeinflussung der Translation vermitteln**

Bei Sirt-1 handelt es sich um eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase der Klasse der Sirtuine, welche in vielen verschiedenen Organismen hochkonserviert vorliegt (Morris 2012). Sirt-1 stellt eine Deacetylase mit zentralen regulatorischen Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen dar und besitzt unter anderem auch in Neuronen zentrale Schlüsselfunktionen (Herskovits und Guarante 2014). So konnte gezeigt werden, dass Sirt-1 eine Rolle bei der Entwicklung von Neuronen, bei der Steuerung des circadianen Rhythmus und bei Prozessen wie Lernen und Gedächtnisbildung besitzt (Herskovits und Guarante 2014). Zudem besitzt Sirt-1 einen Einfluss auf eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und multipler Sklerose (Herskovits und Guarante 2014).

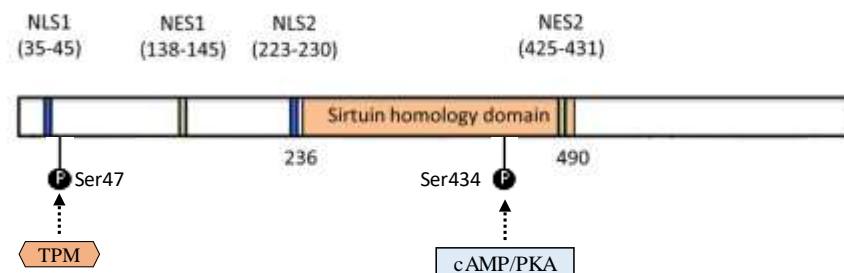
Als eine der wenigen Deacetylasen kann Sirt-1 sowohl im Cytosol, als auch im Zellkern vorliegen und so in beiden Zellkompartimenten Proteine deacetylieren (Morris 2012). Der Transport der Deacetylase vom Cytosol in den Zellkern und zurück wird dabei durch bestimmte Import-Sequenzen (NLS, *nuclear localization signal*) und Export-Sequenzen (NES, *nuclear exportation signal*) innerhalb der 747 Aminosäure umfassenden Proteinsequenz von Sirt-1 ermöglicht (Abbildung 45, Cantó und Auwerx 2012).

Zielproteine im Cytosol, die durch Sirt-1 deacetyliert werden, sind beispielsweise die Acetyl-CoA-Synthetase 1 (AceCS-1), die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), sowie Komponenten der Autophagy-Maschinerie (Cantó und Auwerx 2012). Im Zellkern katalysiert Sirt-1 unter anderem die Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren, sowie von Histonproteinen. Die Histonmodifikationen H3K9ac und H4K16ac stellen dabei sehr spezifische Targets von Sirt-1 dar. Darüber hinaus ist Sirt-1 auch bei der Vermittlung von Histon- und DNA-Methylierungen beteiligt (Jing und Lin 2015). Insbesondere aufgrund der vielfältigen Zielstrukturen im Zellkern besitzt Sirt-1 somit einen umfassenden Einfluss auf Transkriptionsprozesse und beeinflusst auf diesem Weg möglicherweise auch die darauffolgende Translation in den Zellen. Dieser Zusammenhang macht Sirt-1 zum potenziellen

Vermittler einer beeinflussten Translation, welche als Grundlage des Einflusses von GABA auf die TPM Wirkung in Frage kommt.

Die Aktivität von Sirt-1 ist eng an das Vorliegen von  $\text{NAD}^+$  gekoppelt, da bei der Deacetylierung von Proteinen durch Sirt-1 die Acetyl-Gruppe des Zielproteins auf  $\text{NAD}^+$  übertragen wird (Jing und Lin 2015). Allerdings ist heute bereits bekannt, dass nicht nur die Menge von  $\text{NAD}^+$  die Aktivität von Sirt-1 steuert, sondern dass die Sirt-1 Aktivität vielmehr auch durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, beeinflusst werden kann (Sasaki et al. 2008). Bisher sind 13 verschiedene Positionen bekannt, an denen Sirt-1 phosphoryliert werden kann (Sasaki et al. 2008). Einige dieser Phosphorylierungsstellen sind bereits recht gut untersucht, sodass bereits erste Aussagen über die Bedeutung dieser Phosphorylierungen für die Funktion von Sirt-1 getroffen werden können (Abbildung 45).

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Sirt-1 am Serinrest 434, welcher im Bereich der katalytischen Domäne des Proteins liegt, zu einer verstärkten Aktivität von Sirt-1 führt (Abbildung 45, Gerhart-Hines et al. 2011). Nachgewiesen wurde die verstärkte Sirt-1 Aktivität dabei über die Reduktion der PGC-1 $\alpha$ -Acetylierung, einer Sirt-1 spezifischen Zielstruktur. Die detaillierte Analyse der Ser434-Phosphorylierung konnte zudem zeigen, dass diese Phosphorylierung durch den cAMP-PKA-Signalweg vermittelt wird (Gerhart-Hines et al. 2011).



**Abbildung 45: Aufbau des Sirt-1 Proteins mit NLS und NES Sequenzen und den Phosphorylierungsstellen an Ser47 und Ser434**

Das Sirt-1 Protein weist jeweils zwei NLS und zwei NES Sequenzen auf. Die Phosphorylierungsstelle an Ser434 liegt im Bereich der katalytischen Domäne und kann durch den cAMP/PKA Weg vermittelt werden. Die Phosphorylierungsstelle an Ser47 liegt im N-terminalen Bereich und kann möglicherweise durch TPM vermittelt werden.

Abbildung modifiziert nach Cantó und Auwerx 2012.

Diese Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser434 und die damit verbundene Regulierung ihrer Aktivität könnte dabei auch in Verbindung mit einem aktivierten GABAergen System stehen. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung metabotroper GABA-Rezeptoren eine Hemmung von Adenylatcyclasen (AC) hervorrufen kann (Terunuma et al. 2018). Adenylatcyclasen sind Enzyme, die die Umwandlung von ATP in cAMP katalysieren, weshalb eine Aktivierung des GABAergen Systems eine Reduktion des

cAMP-Spiegels der Zellen zur Folge haben kann (Sadana und Dessauer 2009, Terunuma et al. 2018). cAMP stellt einen wichtigen *second messenger* in den Zellen dar, dessen Hauptfunktion die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) darstellt, sodass eine GABA-induzierte Reduktion des cAMP-Spiegels auch eine Hemmung der PKA-Aktivität hervorrufen kann (Terunuma 2018). Auf diese Weise ist es durchaus möglich, dass die Anwesenheit von GABA an den hier verwendeten SHSY-5Y Zellen über die Beeinflussung des cAMP/PKA-Signalweges die Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser434 beeinflusst und so die Aktivität von Sirt-1 reguliert.

Auf diese Weise könnte eine GABA-induzierte Beeinflussung der Sirt-1 Aktivität das zentrale Verbindungsglied zur möglicherweise in Anwesenheit von GABA auftretenden Beeinflussung der Translation darstellen.

Bei der detaillierten Aufklärung dieser möglichen Signalkaskade im Rahmen von zukünftigen Forschungsarbeiten ist allerdings auch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit Hinweise darauf geben, dass eine GABA-induzierte Hemmung der PKA wahrscheinlich nicht den alleinigen Hauptmechanismus darstellt, über den GABA die Sirt-1 Aktivität reguliert und die hemmende Wirkung von TPM hervorruft. Dies zeigt sich dadurch, dass eine Hemmung der PKA-Aktivität über RP-cAMPs alleinig nicht ausreicht, um den gleichen hemmenden Einfluss von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale hervorzurufen, wie er in Anwesenheit von GABA vorliegt (Abbildung 31). Auch hierbei liegt der entscheidende Unterschied in der Ausprägung der TPM-Wirkung auf die letzte durchgeführte Stimulation, was nochmals zeigt, wie wichtig die Durchführung multipler Stimulationen für die Interpretation der Ergebnisse ist. Dass eine Hemmung der PKA mit RP-cAMPs nicht ausreicht, um dieselbe hemmende Wirkung von TPM hervorzurufen, wie sie in Anwesenheit von GABA auftritt, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass eine GABA-induzierte Reduktion des cAMP-Spiegels nicht nur zur Beeinflussung der PKA-Aktivität führen kann. So stellt cAMP beispielsweise nicht nur einen wichtigen Regulator der PKA-Aktivität, sondern auch der Aktivität von Epac (*exchange factor directly activated by cAMP*) dar (Cheng et al. 2008). Da das cAMP-Analogon RP-cAMPs jedoch nur eine spezifische Inhibition der PKA, nicht aber von Epac, hervorruft, ist es möglich, dass dies den Grund dafür darstellt, warum eine RP-cAMPs-induzierte Hemmung der PKA nicht ausreicht, um die gleiche hemmende TPM-Wirkung wie in Anwesenheit von GABA hervorzurufen. Es ist möglich, dass nicht nur die Aktivität der PKA, sondern auch die Aktivität von Epac und der von Epac regulierten Proteinkinasen (z.B. die p38-MAPK) eine Rolle bei der GABA-induzierten Beeinflussung der Sirt-1 Aktivität spielen.

### **5.3.2 Die stimulierende TPM Wirkung steht mit einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern in Verbindung**

Dass die Deacetylase Sirt-1 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale spielt, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit allerdings nicht nur dadurch gezeigt werden, dass Sirt-1 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der hemmenden TPM-Wirkung besitzt. Vielmehr konnte auch nachgewiesen werden, dass Sirt-1 auch eine wichtige Funktion auch bei der Ausbildung der stimulierenden TPM-Wirkung besitzt.

So konnte anhand von immunhistologischen Färbungen und der Durchführung von ELISA-Assays gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit TPM eine Zunahme von pSirt-1 im Zellkern der SHSY-5Y Zellen hervorruft und dass TPM eine gesteigerte Aktivität von Sirt-1 verursacht, da eine Reduktion der Histonmodifikation H3K9ac nachweisbar war (Abbildung 41, Abbildung 42). Diese Ergebnisse geben klare Hinweise darauf, dass TPM einen aktivierenden Einfluss auf Sirt-1 besitzt und dass diese Wirkung mit der stimulierenden TPM-Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale in Verbindung stehen kann.

Die im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit untersuchte Phosphorylierung von Sirt-1 (pSirt-1) liegt am Serinrest 47 und damit im N-terminalen Bereich des Sirt-1 Proteins (Abbildung 45). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser47 sowohl durch die c-Jun N-terminale Kinase JNK1, als auch durch die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase Kinase  $\beta$  (CaMKK) $\beta$  vermittelt werden kann (Nasrin et al. 2009, Wen et al. 2013). Die Phosphorylierung an dieser Position steht dabei mit einer Aktivierung und Stabilisierung von Sirt-1 in Verbindung (Nasrin et al. 2009, Wen et al. 2013). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Ser47-Phosphorylierung von Sirt-1 darüber hinaus allerdings noch andere Funktionen besitzt. Zum einen verändert diese Phosphorylierung die Substratspezifität von Sirt-1, da Sirt-1 nur im phosphorylierten Zustand H3 deacetyliert, wohingegen die Deacetylierung von p53 unabhängig von einer Sirt-1 Phosphorylierung stattfindet (Nasrin et al. 2009). Zum anderen führt die Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser47 auch zu einer vermehrten Translokation von Sirt-1 in den Zellkern, sodass die Phosphorylierung von Sirt-1 an diesen Positionen möglicherweise nicht nur mit einer Aktivierung, sondern auch mit der Lokalisation von Sirt-1 in Verbindung steht (Nasrin et al. 2009).

Auch wenn im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nicht ermittelt werden konnte, welche Kinase die Phosphorylierung von Sirt-1 an der untersuchten Position Ser47 vermittelt, stimmen die erhaltenen Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit dennoch mit den beschriebenen Angaben aus der Literatur überein. So konnte hier gezeigt werden, dass durch TPM eine vermehrte Lokalisation von pSirt-1 im Zellkern auftritt (Abbildung 41) – dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeiten überein, in denen gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung an Ser47 eine gesteigerte Translokation in den

Zellkern verursacht (Nasrin et al. 2009). Zudem konnte hier gezeigt werden, dass gemeinsam mit dem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 auch eine Zunahme der Sirt-1 spezifischen Deacetylierung von H3K9ac auftritt (Abbildung 42), was mit dem Nachweis einer erhöhten Sirt-1 Aktivität durch die Ser47-Phosphorylierung aus anderen Arbeiten übereinstimmt (Nasrin et al. 2009, Wen et al. 2013).

Somit ist es durchaus möglich, dass TPM eine Aktivierung von Sirt-1 hervorruft und diese Aktivierung von Sirt-1 somit auch mit den beschleunigten und verstärkten ACh-induzierten Calciumsignalen in Anwesenheit von TPM in Verbindung steht. Gestützt wird diese Annahme auch dadurch, dass in einer anderen Forschungsarbeit bereits gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung von Sirt-1 zu einer gesteigerten Expression der  $\alpha 7$ -Untereinheit nikotinischer Acetylcholinrezeptoren führt (Cao et al. 2020). Somit könnte TPM über die Aktivierung von Sirt-1 die Expression von Acetylcholin-Rezeptoren beeinflusst, was dann, wie bereits beschrieben, die molekulare Grundlage für die verstärkten und beschleunigten ACh-induzierten Calciumsignale in Anwesenheit von TPM darstellt.

### **5.3.3 Sirt-1 wird möglicherweise komplex reguliert**

In den vorherigen Abschnitten wurde beschrieben, dass die Aktivität von Sirt-1 möglicherweise sowohl durch GABA, als auch durch TPM beeinflusst wird. Das würde bedeuten, dass Sirt-1 einer „Doppelregulation“ unterliegt. Dass das tatsächlich durchaus wahrscheinlich ist, zeigt sich dadurch, dass die TPM-induzierte Zunahme von pSirt-1 im Zellkern auch in Anwesenheit von Inauhzin auftritt und somit unabhängig von der Inauhzin-induzierten Hemmung von Sirt-1 vermittelt wird (Abbildung 43).

Wie genau diese doppelte Regulation auf molekularer Ebene ablaufen könnte, konnte im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit nicht aufgeklärt werden. Das liegt zum Teil auch daran, dass Inauhzin zwar als spezifischer Sirt-1 Inhibitor beschrieben wird, aber noch recht wenig über den genauen Mechanismus der hervorgerufenen Sirt-1 Hemmung bekannt ist. Die Wirkung von Inauhzin wurde bisher vor allem auf Substratebene untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass Inauhzin die Sirt-1 spezifische Deacetylierung von p53 hemmt (Zhang Y. et al. 2012, Zhang Qi et al. 2012). Der genaue Mechanismus, über den Inauhzin Sirt-1 hemmt, ist allerdings bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei anderen Sirt-1 Inhibitoren, wie Ex-527, konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Sirt-1 auf einer Blockade der Produktfreisetzung beruht (Gertz et al. 2013). Es ist möglich, dass Inauhzin die Sirt-1 Aktivität auf ähnliche Weise hemmt.

Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inauhzin weder ACh-induzierte Calciumsignale, noch das Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern der Neurone beeinflusst (Abbildung 34, Abbildung 43). Dennoch führt die Anwesenheit von Inauhzin zu einem hemmenden Einfluss von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale (Abbildung 35). Das zeigt, dass möglicherweise die TPM-induzierte Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser47 bei gleichzeitiger Beeinflussung ihrer enzymatischen Aktivität die Grundlage für die hemmende TPM-Wirkung darstellt. Möglicherweise stellen also die

Beeinflussung der Aktivität von Sirt-1 durch Inauhzin und die Beeinflussung von Sirt-1 durch die Phosphorylierung zwei Prozesse dar, welche zusammenwirken und sich gegenseitig beeinflussen.

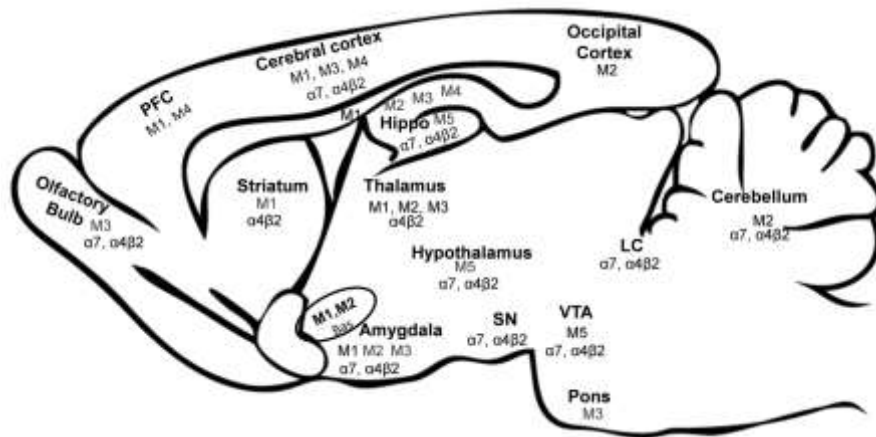
Auf diese Weise könnte auch die hemmende TPM-Wirkung in Anwesenheit von GABA erklärt werden. Wie bereits beschrieben, könnte GABA unter anderem über den cAMP-PKA-Signalweg zu einer Reduktion der Phosphorylierung von Sirt-1 an Ser434 führen und dadurch die Aktivität von Sirt-1 reduzieren. Somit läge bei der Vorbehandlung der Zellen mit GABA + TPM ebenfalls eine reduzierte Sirt-1 Aktivität gemeinsam mit einem verstärkten, durch TPM induzierten, Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern vor, was auch hierbei die molekulare Grundlage der hemmenden TPM Wirkung darstellen könnte.

Diese Zusammenhänge stellen somit vielversprechende Ansätze zur Aufklärung der TPM-Wirkung in An- und Abwesenheit von GABA dar. Jedoch ist noch eine Reihe weiterer Experimente nötig, um den genauen Wirkmechanismus aufklären zu können. So muss beispielsweise aufgeklärt werden, ob GABA tatsächlich die Phosphorylierung von Sirt-1 beeinflusst, ob sich dies auf die Aktivität von Sirt-1 auswirkt, ob TPM auch zum verstärkten Vorliegen von Phosphorylierungen an anderen Positionen führt und ob sich die Phosphorylierungen an unterschiedlichen Positionen gegenseitig beeinflussen etc..

## **5.4 Ausblick**

### **5.4.1 Die TPM-Wirkung auf das cholinerge System ist wichtig für die zukünftige Forschung**

In früheren Forschungsarbeiten wurde bisher nur die Wirkung von TPM auf das metabotrope cholinerge System untersucht. Begründet wurde dies damit, dass muskarine AChR die wichtigsten cholinergen Rezeptoren im Gehirn darstellen und dass der größte Teil der cholinergen Signaltransmission über das metabotrope cholinerge System abläuft (Palmieri et al. 2000, D'Antuono et al. 2007). Diese Einschätzung hält heutigen Erkenntnissen nicht mehr stand, da heute bekannt ist, dass auch nikotinische, ionotrope AChR wichtige Funktionen im zentralen Nervensystem besitzen und weit verbreitet in vielen Hirnregionen vorliegen (McKay et al. 2007, Ahmed et al. 2017, Abbildung 46).



**Abbildung 46: Übersicht über das Vorliegen der wichtigsten nAChR- und mAChR-Untereinheiten in verschiedenen Regionen des Gehirns**

PFC: Präfrontaler Cortex, LC: Locus Caeruleus, SN: Substantia nigra, VTA: Area tegmentalis ventralis  
Bildquelle: Ahmed et al 2017.

Im Säugerhirn spielt ACh als neuromodulatorischer Transmitter bei der Regulation der erregenden und hemmenden Signaltransmission eine wichtige Rolle und steuert sowohl die Freisetzung von Glutamat und GABA, als auch die intrinsische Erregbarkeit der Neurone (Becchetti et al. 2015). Aus diesem Grund führen auch Fehlfunktionen des cholinergen Systems zur Ausbildung schwerer neurologischer Erkrankungen, wie Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie oder eben auch Epilepsie (McKay et al. 2007). Dennoch liegen bis heute zur Behandlung vieler Erkrankungen, die auf einer Fehlfunktion des cholinergen Systems beruhen, nur wenige Medikamente vor, die direkt auf das cholinerge System ausgerichtet sind (Oyler et al. 2018). Das Ergebnis der hier durchgeführten Arbeit, dass das TPM auch ACh-induzierte Calciumsignale moduliert, macht TPM zu einem solchen potenziellen Wirkstoff, der zur Modulation des cholinergen Systems eingesetzt werden kann. Über die Beeinflussung der ACh-induzierten Signaltransmission kann TPM einen entscheidenden Einfluss auf andere Neurotransmittersysteme ausüben und so nicht nur bei der Behandlung von Epilepsien Fehlregulationen zwischen Erregung und Hemmung auf Ebene des Gesamtnetzwerkes beeinflussen. Somit stellen die hier erhaltenen Ergebnisse eine wichtige Grundlage für weitere Wirkungsanalyse neuromodulativer Stoffe wie TPM auf die cholinerge Signaltransmission dar.

#### **5.4.1.1 TPM-Wirkung auf Sirt-1: Neuinterpretation der Wirkung von TPM auf weitere Krankheitsbilder**

TPM stellt nicht nur zur Behandlung von Epilepsie einen sehr potenten Wirkstoff dar, sondern kommt auch als (potenzieller) Wirkstoff zur Behandlung einer Reihe anderer Erkrankungen in Frage. So wird

TPM auch zur Behandlung von Migräne eingesetzt und verschiedene Forschungsarbeiten geben bereits deutliche Hinweise darauf, dass TPM auch zur Behandlung von Neuralgien, Diabetes und Fettleibigkeit eingesetzt werden kann (Shank und Maryanoff 2008). In vielen Fällen basieren die Erkenntnisse, dass diese Erkrankungen ebenfalls mit TPM behandelt werden können, auf Patientenstudien, bei denen positive Auswirkungen der Verabreichung von TPM auf die Krankheitsbilder und –symptome beobachtet wurden (Shank und Maryanoff 2008). Eine umfassende Beschreibung molekularer Prozesse, die der Wirksamkeit von TPM bei der Behandlung dieser weiteren Erkrankungen zugrunde liegen, liegt in vielen Fällen bisher noch nicht vor (Shank und Maryanoff 2008).

Betrachtet man die Erkrankungen, für die TPM möglicherweise im *off-label use* angewendet werden kann, ist auffällig, dass sich bei vielen dieser Erkrankungen auch die Verabreichung von Sirt-1 Agonisten als möglicher Therapieansatz erwiesen hat. Diese Übereinstimmungen könnten mit der im Rahmen der hier durchgeführten Arbeit aufgestellten Hypothese, dass TPM eine Aktivierung von Sirt-1 hervorruft, erklärt werden.

So konnte in verschiedenen Patientenstudien eine schmerzlindernde Wirkung von TPM bei der Anwendung bei Neuralgien nachgewiesen werden (Raskin et al. 2004, Carroll et al. 2004, Durand et al. 2005, Benoliel et al. 2007, Siniscalchi et al. 2007). Eine ebenfalls schmerzlindernde Wirkung wurde auch bei der Verabreichung von Agonisten von Sirt-1 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Sirt-1 Agonisten im Neuralgie-Modellsystem einen entzündungshemmenden Einfluss besitzen und die Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie) senken (Ly et al. 2015). Somit stellt die Aktivierung von Sirt-1 eine alternative Strategie bei der Behandlung von Neuralgien dar. Auf diese Weise könnte eine TPM-induzierte Aktivierung von Sirt-1 auch eine mögliche Grundlage der schmerzlindernden Wirkung von TPM darstellen.

Über die Wirkung von TPM zur Behandlung von Diabetes und Fettleibigkeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass TPM die  $\beta$ -Oxidationsrate steigern kann und die Insulin-Insensitivität aufheben kann (Frigerio et al. 2006, Wilkes et al. 2005a, Wilkes et al. 2005b, Liang et al. 2005). Eine Steigerung der  $\beta$ -Oxidationsrate konnte experimentell auch durch eine Aktivierung von Sirt-1 hervorgerufen werden kann (Nogueiras et al. 2012, 22811431, Lavu et al. 2008, Sun et al 2007). Aufgrund dieser übereinstimmenden Wirkung zwischen TPM und Sirt-1 Agonisten kommt eine TPM-vermittelte Sirt-1 Aktivierung auch als Grundlage der TPM-Wirkung bei Diabetes und Fettleibigkeit in Frage.

In Bezug auf Migräne-Erkrankungen, bei denen TPM bereits zur effektiven Behandlung eingesetzt wird, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sirt-1 einen protektiven Effekt auf die mitochondrielle Funktion in einem Ratten-Modellsystem chronischer Migräne besitzt und somit einen positiven Einfluss auf diese Erkrankung besitzen kann (Liang et al. 2021). Somit könnte auch hier eine TPM-induzierte Aktivierung



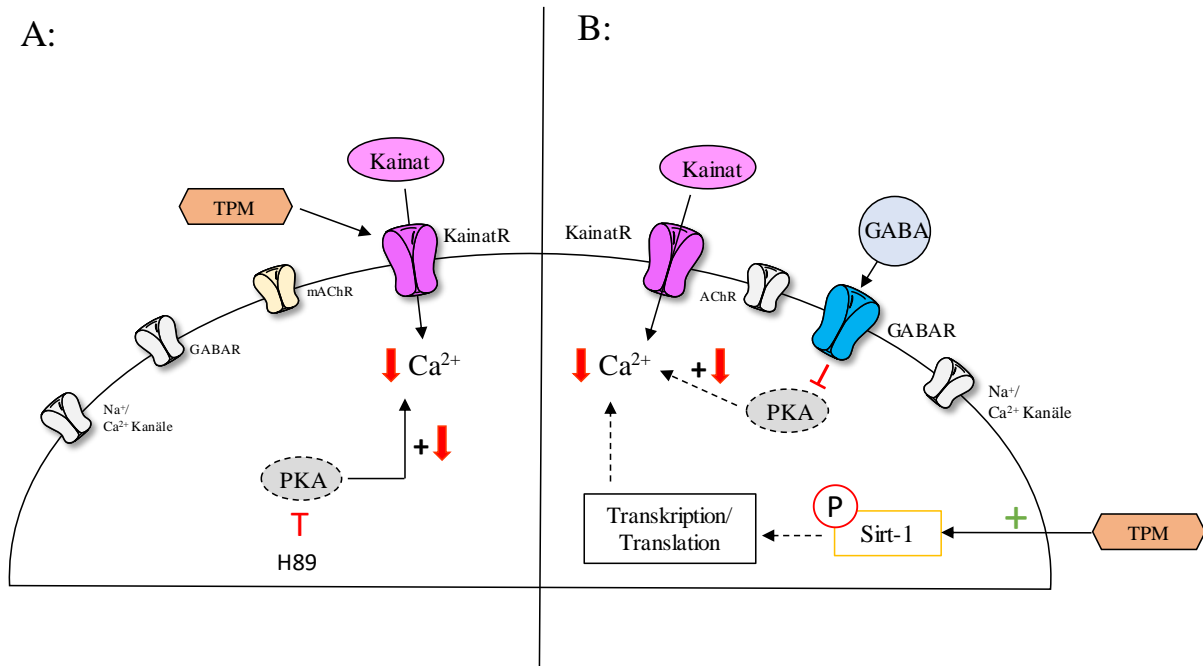
von Sirt-1 den möglichen molekularen Mechanismus darstellen, der TPM zu einem potenten Wirkstoff zur Behandlung von Migräne macht.

#### **5.4.2 GABA beeinflusst die TPM-Wirkung: Neuinterpretation der Wirkung von TPM auf das glutamaterge System**

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit, dass sich die Wirkung von TPM in An- und Abwesenheit von GABA deutlich voneinander unterscheidet, zeigt, dass die isolierte Betrachtung der Wirkung von TPM auf nur ein Transmittersystem möglicherweise nicht immer die korrekte Interpretation der TPM-Wirkung zulässt. Somit kann es durchaus wichtig und auch notwendig sein, den Einfluss der hemmenden Signaltransmission auf die TPM-Wirkung auch in Zukunft zu berücksichtigen.

So wäre es beispielsweise zumindest theoretisch möglich, dass GABA auch die Wirkung von TPM auf das glutamaterge System beeinflusst.

Für die Wirkung von TPM auf das glutamaterge System konnte unter anderem gezeigt werden, dass TPM an Astrocyten einen hemmenden Einfluss auf Kainat-induzierte Calciumsignale besitzt (Ängel et al. 2004). Diese hemmende Wirkung von TPM kann verstärkt werden, wenn die Zellen vor der Behandlung mit TPM mit dem PKA-Inhibitor H89 inkubiert werden. Erklärt wurde dieses Ergebnis dadurch, dass die Anwesenheit von H89 dazu führt, dass mögliche Zielstrukturen von TPM, - wie die AMPA-Rezeptoren-, unphosphoryliert vorliegen, wodurch TPM eine höhere Wirksamkeit besitzt (Abbildung 47, A ; Ängel et al. 2004). Was dieses Ergebnis unter physiologischen Bedingungen bedeutet, wurde allerdings nicht näher beschrieben.



**Abbildung 47: Schematische Darstellung der TPM Wirkung auf Kainat-induzierte Calciumsignale basierend auf der Arbeit von Ängel et al (2004) (A) und unter Anwendung der hier neu aufgestellten Hypothese des Wirkmechanismus (B)**

**A:** Es konnte gezeigt werden, dass TPM einen hemmenden Einfluss auf Kainat-induzierte Calciumsignale besitzt und dass die Hemmung der PKA über den Inhibitor H89 diese Wirkung zusätzlich verstärkt.

**B:** In Anlehnung an die hier neu aufgestellte Hypothese zum Wirkmechanismus von TPM könnte auch eine Beeinflussung der Sirt-1 Aktivität durch TPM die Grundlage für den hemmenden Einfluss von TPM auf Kainat-induzierte Calciumsignale darstellen. Eine Hemmung der PKA, welche zur Verstärkung der hemmenden TPM-Wirkung führt, könnte dabei durch die Aktivierung des GABAergen Systems hervorgerufen werden.

Unter Anwendung der hier neu aufgestellten Hypothese zum Wirkmechanismus von TPM lässt sich der hemmende Einfluss von TPM auf Kainat-induzierte Calciumsignale dabei möglicherweise auch über eine TPM-induzierte Aktivierung von Sirt-1 erklären (Abbildung 47, B). Dabei könnte TPM über die Aktivierung von Sirt-1 und die Beeinflussung von Transkriptions-/Translationsprozessen einen hemmenden Einfluss auf Kainat-induzierte Calciumsignale besitzen. Dabei ist es durchaus möglich, dass die Aktivierung von Sirt-1 durch TPM unterschiedliche, hemmende und erregende, Auswirkungen auf unterschiedliche Signaltransmissionssysteme besitzt.

Im physiologischen Kontext liegt natürlich kein H89 vor, welches eine Hemmung der PKA hervorrufen könnte. Allerdings könnte eine Hemmung der PKA im physiologischen Kontext, wie bereits beschrieben, durch die Anwesenheit von GABA hervorgerufen werden (Terunuma 2018). Somit könnte unter physiologischen Bedingungen eine GABA-induzierte Hemmung der PKA ausreichend sein um eine Verstärkung der hemmenden TPM-Wirkung auf Kainat-induzierte Calciumsignale hervorzurufen (Abbildung 47, B).

Da der Einfluss von GABA bei den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von TPM in dieser Form noch nicht berücksichtigt wurde, müsste diese Hypothese natürlich noch durch entsprechende Versuche genauer charakterisiert werden. Dabei ist auch zu beachten, dass mittlerweile bekannt ist, dass H-89, obwohl oft als „spezifischer“ PKA-Inhibitor verwendet, auch eine Reihe von anderen Kinasen unspezifisch hemmen kann (Lochner und Moolman 2006). Zudem besitzt H89 noch eine Reihe weiterer Einflüsse, die unabhängig von einer Hemmung der PKA stehen. So konnte gezeigt werden, dass H89 als Antagonist von  $\beta$ -Adrenorezeptoren wirken kann und SERCA-Pumpen in Muskelzellen hemmt. Zudem konnte eine hemmende Wirkung von H89 auf spannungsabhängige Kaliumkanäle nachgewiesen werden (Lochner und Moolman 2006). Aus diesem Grund müsste zunächst durch die Verwendung anderer, spezifischer PKA-Inhibitoren bestätigt werden, dass die Hemmung der PKA tatsächlich die hemmende TPM-Wirkung auf Kainat-induzierte Calciumsignale verstärkt, bevor der Einfluss von GABA auf diese Wirkung umfassend charakterisiert werden kann.

### **5.4.3 Die gewonnenen Erkenntnisse helfen auch dem Verständnis der neuronalen Regulation**

Die Ergebnisse dieser Arbeit helfen allerdings nicht nur dabei, ein besseres Verständnis über die Wirkungseigenschaften von TPM zu erlangen, sondern können darüber hinaus auch dazu dienen, umfassendere Einblicke in die Regulation der neuronalen Signaltransmission und Homöostase zu gewinnen.

So kann beispielsweise das Ergebnis, dass die Aktivität von Sirt-1 einen Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale besitzen kann, die Grundlage dafür darstellen, die Funktion dieser Deacetylase auch bei der zukünftigen Erforschung der cholinergen Signaltransmission und ihrer intrinsischen Regulation zu berücksichtigen. Die Vielzahl an Signalwegen, die durch Sirt-1 reguliert und beeinflusst werden kann, macht die Untersuchung von Sirt-1 im Zusammenhang mit der cholinergen Signaltransmission zu einem interessanten Forschungsschwerpunkt. Wenn durch zukünftige Forschung aufgeklärt werden kann, welche Signalwege bei der Regulation von und durch Sirt-1 in Bezug auf das cholinerge System eine Rolle spielen, kann dies einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieses Transmittersystems und seiner Regulation leisten.

Dasselbe gilt dabei auch für die Rolle von Sirt-1 in Bezug auf das GABAerge System. Das Ergebnis, dass GABA möglicherweise über die Aktivität von Sirt-1 die Translation der Zellen moduliert, konnte in anderen Arbeiten in dieser Form noch nicht nachgewiesen werden und stellt somit eine ganz neue Erkenntnis der GABA-induzierten neuronalen Regulation dar. Somit kann auch die Aufklärung der dabei zugrundeliegenden Signalprozesse helfen, ein besseres Verständnis über den Einfluss der hemmenden neuronalen GABA-Signaltransmission zu erhalten.

## 6 Zusammenfassung

Eine TPM-induzierte Beeinflussung intrinsischer, regulatorischer Signalkaskaden stellt einen potenziellen Wirkmechanismus dar, über den TPM die neuronale Signaltransmission auf vielfältige Art und Weise moduliert. Diese Hypothese wurde durch die Verwendung der humanen Neuroblastomzelllinie SHSY-5Y auf Einzelzellebene detailliert analysiert.

Dazu wurde die Wirkung von TPM auf Acetylcholin (ACh)-induzierte Calciumsignale an SHSY-5Y-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass TPM eine Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale hervorruft. Überraschenderweise wird diese TPM-Wirkung durch die Anwesenheit von GABA beeinflusst, sodass TPM einen hemmenden Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale in Anwesenheit von GABA aufweist. Durch die genauere Analyse dieser hemmenden TPM-Wirkung konnte gezeigt werden, dass die Deacetylase Sirt-1 eine Schlüsselfunktion sowohl bei der Ausbildung der hemmenden, als auch bei der Ausbildung der stimulierenden TPM-Wirkung besitzt. Diese Ergebnisse geben einen klaren Hinweis darauf, dass die Wirkung von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale über die Beeinflussung der Sirt-1 Aktivität vermittelt wird – ein Aspekt der auch in zukünftigen Untersuchungen der Wirkungseigenschaften von TPM berücksichtigt werden sollte.

## 7 Summary

The modulation of intrinsic regulatory signaling cascades is a potential mechanism of action through which TPM modulates the neuronal signal transmission. This hypothesis was investigated on single cell level by using the human neuroblastoma cell line SHSY-5Y.

To elucidate the underlying mechanism of action, the effect of TPM on acetylcholine (ACh) -induced calcium signals was investigated on SHSY-5Y cells. It could be shown that TPM increases and accelerates ACh-induced calcium signals. Surprisingly, the inhibitory neurotransmitter GABA reverts this TPM effect: TPM has an inhibitory effect on ACh-induced calcium signals in the presence of GABA. A detailed analysis of this inhibiting TPM effect could show that the deacetylase Sirt-1 has a key function both in the development of the inhibitory as well as in the development of the stimulating TPM effect. These results provide a strong indication that the effect of TPM on ACh-induced calcium signals is mediated by a TPM-induced modulation of the Sirt-1 activity - an aspect that should also be taken into account in future studies concerning TPM's effects.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

#### Einleitung

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines neuronalen Netzwerkes anhand des Aufbaus des präfrontalen Cortex (PFC).....	8
Abbildung 2: Übersicht verschiedener Rezeptor- und Ionenkanaluntereinheiten, deren Mutationen mit der Entstehung von Epilepsie in Verbindung gebracht werden.....	10
Abbildung 3: Lokalisation nikotinischer Acetylcholinrezeptoren auf Pyramidenzellen und Interneuronen im Cortex.....	12
Abbildung 4: Übersicht verschiedener antiepileptische Wirkstoffe und ihrer Zielstrukturen und Wirkungseigenschaften.....	14
Abbildung 5: Chemische Strukturformel von Topiramamat (TPM).....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der möglichen Wirkung von TPM in einem Netzwerkverbund.....	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Analyse der Wirkungseigenschaften von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von GABA im Einzelzell-Modellsystem.....	20

#### Material und Methoden

Abbildung 8: Proliferationsfaktor ausdifferenzierter und undifferenzierter SHSY-5Y Zellen (A) und mikroskopische Aufnahmen (B, C).....	30
Abbildung 9: Glasdeckgläschen, auf denen die Wachstumsfläche der Zellen mit Hilfe eines schwarzen Plastikringes begrenzt ist.....	30
Abbildung 10: Ober- und Unterseite der Durchflussskammern.....	31
Abbildung 11: Schematische Übersicht über die zeitlichen Abläufe der Calcium-Imaging Experimente.....	32
Abbildung 12: Schematischer (A) und technischer Aufbau (B) des Durchflusssystems mit Markierung aller Zu- und Abläufe (B) und Steuerungseinheit der Zuläufe (C).....	35
Abbildung 13: Bildausschnitt mit den markierten lokalen Maxima nach Anwendung der FindFoci-Funktion (A) und nach Anwendung des ROI-Makros (B).....	37
Abbildung 14: qRT-Zyklus-Protokoll.....	39
Abbildung 15: 12-Well-Silikonkammer auf einem Objektträger.....	41
Abbildung 16: Bildausschnitt mit den markierten Cytoplasma ROI's (A) und den markierten Zellkern ROI's (B).....	43
Abbildung 17: Markierung der Zellkerne (A), entfernen der Zellkerne (B) und Markierung des Cytoplasmas ohne Einbezug der Zellkerne (Threshold-Minimum = 1).....	44
Abbildung 18: 30 $\mu$ M TPM verstärkt den ACh-induzierten Calciumeinstrom an undifferenzierten (A) und differenzierten Zellen (B) nach einmaliger Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh.....	48
Abbildung 19: Beispielverlauf der Fluoreszenzintensität (mittlerer Grauwert) einer Zelle während der multiplen Stimulation.....	49
Abbildung 20: Berechnung des Variationskoeffizienten vor Zugabe der Stimulation.....	51
Abbildung 21: Schematische Darstellungen der Einteilung der Zellen.....	52
Abbildung 22: Bildausschnitt gemessener Zellen (A) und der zeitliche Verlauf ihrer Fluoreszenzintensitäten (B), Zugabe der Stimulation mit Pfeil markiert.....	53

Abbildung 23: Schematische Darstellung des absoluten (A) und relativen (B) Verlaufes der Fluoreszenzintensität und der Berechnung der Reaktionsparameter (C) .....	54
Abbildung 24: Eine kurze Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit TPM hat keinen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh .....	57
Abbildung 25: Die längere Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit 30 $\mu$ M TPM führt zu einer Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh .....	58
Abbildung 26: TPM verstärkt und beschleunigt auch Nikotin-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation .....	61
Abbildung 27: Die Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit GABA hat nur einen schwachen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während multipler Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh .....	65
Abbildung 28: In Anwesenheit von GABA ist ein hemmender Einfluss von TPM auf ACh-induzierte Calciumsignale nachweisbar .....	67
Abbildung 29: Einfluss des GABAergen Systems auf PKA und Proteindeacetylasen .....	69
Abbildung 30: Die Vorbehandlung der Zellen mit TSA führt im Gegensatz zur die Vorbehandlung mit RP-cAMPs zu keiner Beeinflussung ACh-induzierter Calciumsignale .....	70
Abbildung 31: TPM zeigt in Anwesenheit von RPAcAMPs nur bei der ersten Stimulation eine hemmende Wirkung auf die ACh-induzierten Calciumsignale .....	72
Abbildung 32: TPM zeigt in Anwesenheit von TSA keinen hemmenden Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh .....	74
Abbildung 33: Die Deacetylase Sirt-1 kann in Anwesenheit von GABA doppelt reguliert sein .....	75
Abbildung 34: Die Vorbehandlung der Zellen mit 0,2 $\mu$ M Inauhizin hat keinen Einfluss auf ACh-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5 $\mu$ M ACh .....	76
Abbildung 35: TPM zeigt in Anwesenheit des Sirt-1 Inhibitors Inauhizin eine hemmende Wirkung auf ACh-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit ACh .....	77
Abbildung 36: Einfluss des GABAergen Systems auf die Transkription und Translation der Zellen über eine Hemmung der Sirt-1 Aktivität .....	78
Abbildung 37: Sowohl die Vorbehandlung der Zellen mit ActD, als auch mit dem Inhibitormix, führt zu einer Verstärkung und Beschleunigung ACh-induzierter Calciumsignale .....	80
Abbildung 38: Die Vorbehandlung der Zellen mit Emetin besitzt keinen Einfluss auf die ACh-induzierten Calciumsignale .....	82
Abbildung 39: Einfluss von 1 $\mu$ M Emetin auf die Proteintranslation, nachgewiesen im Puromycin-Assay .....	83
Abbildung 40: In Anwesenheit von Emetin zeigt TPM eine hemmende Wirkung auf die Reaktionsstärke ACh-induzierter Calciumsignale .....	84
Abbildung 41: Die Vorbehandlung mit TPM führt zu einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern .....	86
Abbildung 42: Die Vorbehandlung mit 30 $\mu$ M TPM reduziert die Menge an H3K9ac .....	88
Abbildung 43: Die Vorbehandlung mit TPM + Inauhizin führt ebenfalls zu einem vermehrten Vorliegen von pSirt-1 im Zellkern .....	89

## Diskussion

Abbildung 44: Schematische Darstellung der bisher angenommen Wirkungsweise von TPM (A) und der neuen Hypothese zum Wirkmechanismus (B) .....	91
Abbildung 46: Aufbau des Sirt-1 Proteins mit NSL und NES Sequenzen und den Phosphorylierungsstellen an Ser47 und Ser434 .....	98
Abbildung 47: Übersicht über das Vorliegen der wichtigsten nAChR- und mAChR-Untereinheiten in verschiedenen Regionen des Gehirns .....	103

Abbildung 48: Schematische Darstellung der TPM Wirkung auf Kainat-induzierte Calciumsignale basierend auf der Arbeit von Ängel et al (2004) (A) und unter Anwendung der hier neu aufgestellten Hypothese des Wirkmechanismus (B) ..... 106

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>AChR</b>	Acetylcholin-Rezeptor
<b>ActD</b>	Actinomycin D
<b>adnFLE</b>	autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie
<b>AED</b>	antiepileptic drug
<b>AM</b>	Acetoxymethylester
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
<b>AMPK</b>	AMP-aktivierte Proteinkinase
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
<b>CA</b>	Carboanhydrase
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cGMP</b>	cyclisches Guanosin-Monophosphat
<b>CICR</b>	calcium induced calcium release
<b>CNG</b>	Cyclic nucleotide-gated ion channels
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DEPC</b>	Diethyldicarbonat
<b>DIV</b>	days <i>in-vitro</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>Eme</b>	Emetin
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>g</b>	Gramm
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GC</b>	Guanylatcyclase



<b>GIRK</b>	G-protein-activated inwardly-rectifying K <sup>+</sup> -channel
<b>HCN</b>	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
<b>IICR</b>	inositol induced calcium release
<b>l</b>	Liter
<b>mAChR</b>	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
<b>min</b>	Minute
<b>mM</b>	milli-molar
<b>μM</b>	mikro-molar
<b>mRNA</b>	messenger-Ribonukleinsäure
<b>n</b>	Stichprobenumfang
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>nAChR</b>	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NB</b>	Neurobasal
<b>NBT</b>	Nitroblue-Tetrazolium
<b>Nik</b>	Nikotin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PFC</b>	präfrontaler Cortex
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PP</b>	Plateaupotenzial
<b>PV</b>	Paralvumin-positive Interneurone
<b>Pyr</b>	Pyramidenneurone
<b>qRT</b>	quantitative PCR/real-time PCR
<b>RA</b>	Retinalsäure
<b>ROI</b>	region of interest
<b>s</b>	Sekunde
<b>SER</b>	spontaneously epileptic rat
<b>sig</b>	signifikant
<b>SOM</b>	Somatostatin-positive Interneurone
<b>SST</b>	Somatostatin-positive Interneurone

<b>TE</b>	Trypsin/EDTA
<b>TPM</b>	Topiramate
<b>TSA</b>	Trichostatin A
<b>ü.N.</b>	über Nacht
<b>VGCC</b>	voltage-gated calcium channel
<b>vgl.</b>	vergleiche...
<b>VIP</b>	Vasoaktives Intestinalpeptid-positive Interneurone
<b>VK</b>	Variationskoeffizient
<b>WB</b>	Western Blot
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>zChL</b>	zentrales Chemikalienlager

### 8.3 Literaturverzeichnis

- Agholme, L., Lindström, T., Kgedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010).** An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(4), 1069–1082. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091363>
- Ahmed, T., Zahid, S., Mahboob, A., & Farhat, S. M. (2016).** Cholinergic System and Post-translational Modifications: An Insight on the Role in Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 15(4), 480–494 <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160325121145>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009).** Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiology Review*, 89(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008.Mammalian>
- Andersson, H., Björnström, K., Eintrei, C., & Sundqvist, T. (2015).** Orexin phosphorylates the  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor  $\beta 2$  subunit on a serine residue and changes the surface expression of the receptor in SH-SY5Y cells exposed to propofol. *Journal of Neuroscience Research*, 93(11), 1748–1755. <https://doi.org/10.1002/jnr.23631>
- André, E. A., Forcelli, P. A., & Pak, D. T. (2018).** What goes up must come down: Homeostatic synaptic plasticity strategies in neurological disease. *Future Neurology*, 13(1), 13–21. <https://doi.org/10.2217/fnl-2017-0028>
- Ängelagen, M., Ben-Menachem, E., Shank, R., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2004).** Topiramate modulation of kainate-induced calcium currents is inversely related to channel phosphorylation level. *Journal of Neurochemistry*, 88(2), 320–325. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02186.x>
- Ängelagen, M., Rönnbäck, L., Hansson, E., & Ben-Menachem, E. (2005).** Topiramate reduces AMPA-induced Ca<sup>2+</sup> transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *Journal of Neurochemistry*, 94(4), 1124–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03259.x>
- Bannister, R. A., Melliti, K., & Adams, B. A. (2004).** Differential Modulation of Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> Channels by G $\alpha$ q/11-Coupled Muscarinic Receptors. *Molecular Pharmacology*, 65(2), 381–388. <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.381>
- Beaudoin, G. M. J., Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012).** Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols*, 7(9), 1741–1754. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099>
- Becchetti, A., Aracri, P., Meneghini, S., Brusco, S., & Amadeo, A. (2015).** The role of nicotinic acetylcholine receptors in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00022>
- Benoliel, R., Sharav, Y., & Eliav, E. (2007).** Painful Posttraumatic Trigeminal Neuropathy: A Case Report of Relief with Topiramate. *Cranio: The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice*, 25:1, 57–62. <https://doi.org/10.1179/crn.2007.010>

- Bensaude, O. (2011).** Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription*, 2(3), 103–108. <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>
- Bertrand, D., & Bertrand, S. (2003).** Overview of Electrophysiological Characterization of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Protocolls in Pharmacology* 11.7.1-11.7.24.
- Bhatia, A., Moza, S., & Bhalla, U. S. (2019).** Precise excitation-inhibition balance controls gain and timing in the hippocampus. *ELife*, 8, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.43415>
- Bloem, B., Poorthuis, R. B., & Mansvelter, H. D. (2014).** Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: The role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00017>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2013).** Targeting SIRT1 to improve metabolism: all you need is NAD + *Europe PMC Funders Group Author Manuscript*, 64(1), 166–187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905.Targeting>
- Cao, K., Dong, Y., Xiang, J., Xu, Y., Li, Y., Song, H., ... Guan, Z. (2020).** The neuroprotective effects of SIRT1 in mice carrying the APP/PS1 double-transgenic mutation and in SH-SY5Y cells over-expressing human APP670/671 may involve elevated levels of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors *Aging* 2020 12(2), 1792–1807.
- Carroll, D. G., Kline, K. M., & Malnar, K. F. (2004).** Role of topiramate for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. *Pharmacotherapy*, 24(9), 1186–1193. <https://doi.org/10.1592/phco.24.13.1186.38096>
- Cash, S. S., & Hochberg, L. R. (2015).** The Emergence of Single Neurons in Clinical Neurology. *Neuron*, 86(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.058>.
- Castel-Branco, M. M., Alves, G. L., Figueiredo, I. V., Falcão, A. C., & Caramona, M. M. (2009).** The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31(2), 101–106. <https://doi.org/10.1358/mf.2009.31.2.1338414>
- Caulfield, M. P. (1993).** Muscarinic Receptors-Characterization, coupling and function. *Pharmacology and Therapeutics*, 58(3), 319–379. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90027-B](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90027-B)
- Cayre, M., Buckingham, S. D., Yagodin, S., & Sattelle, D. B. (1999).** Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine. *Journal of Neurophysiology*, 81(1), 1–14. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.1.1>
- Chang, H. C., & Guarente, L. (2014).** SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(3), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.001>
- Chao, L. C., & Tontonoz, P. (2012).** SIRT1 regulation-it ain't all NAD. *Molecular Cell*, 45(1), 9–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.017>
- Chavez-Noriega, L. E., Crona, J. H., Washburn, M. S., Urrutia, A., Elliott, K. J., & Johnson, E. C. (1997).** Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$  and  $\alpha 7$  expressed in xenopus oocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 346–356.

- Chebib, M., & Johnston, A. R. (1999).** THE 'ABC' OF GABA RECEPTORS: A BRIEF REVIEW. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26, 937–940.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., & Mei, F. (2008).** Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(7), 651–662. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x>
- Cheng, F., Su, L., Yao, C., Liu, L., Shen, J., Liu, C., ... Qian, C. (2016).** SIRT1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer by regulating Fra-1 expression. *Cancer Letters*, 375(2), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.010>
- Christensen, A. E., Selheim, F., De Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K. K., ... Døskeland, S. O. (2003).** cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase: Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35394–35402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302179200>
- Cooper, E. C. (2007).** (What to Do) When Epilepsy Gene Mutations Stop Making Sense. *Epilepsy Currents*, 7(1), 23–25. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2007.00157.x>
- Curia, G., Aracri, P., Sancini, G., Mantegazza, M., Avanzini, G., & Franceschetti, S. (2004).** Protein-kinase C-dependent phosphorylation inhibits the effect of the antiepileptic drug topiramate on the persistent fraction of sodium currents. *Neuroscience*, 127(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.040>
- Criado, M., Valor, L. M., Mulet, J., Gerber, S., Sala, S., & Sala, F. (2012).** Expression and functional properties of  $\alpha 7$  acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*, 123(4), 504–514. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07931.x>
- Dajas-Bailador, F. A., Mogg, A. J., & Wonnacott, S. (2002).** Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: Contribution of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup> stores. *Journal of Neurochemistry*, 81(3), 606–614. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00846.x>
- Dani, V. S., Chang, Q., Maffei, A., Turrigiano, G. G., Jaenisch, R., & Nelson, S. B. (2005).** Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12560–12565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506071102>
- D'Angelo, E. (2010).** Homeostasis of intrinsic excitability: Making the point. *Journal of Physiology*, 588(6), 901–902. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187559>
- D'Antuono, M., Kawasaki, H., Palmieri, C., Curia, G., Biagini, G., & Avoli, M. (2007).** Antiepileptic drugs and muscarinic receptor-dependent excitation in the rat subiculum. *Neuropharmacology*, 52(5), 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.01.008>
- Davis, G. W. (2006).** Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 307–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135751>

- DeLorenzo, R. J., Sombati, S., & Coulter, D. A. (2000).** Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1), 40–44. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02170.x>
- Deshmukh, R., Thakur, A. S., & Dewangan, D. (2011).** Mechanism of Action of Anticonvulsant Drugs: a Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 225–236.
- Durand, J., Alexandre, J., Guillevin, L., & Goldwasser, F. (2005).** Clinical activity of venlafaxine and topiramate against oxaliplatin-induced disabling permanent neuropathy. *Anti-Cancer Drugs*, 16, 587–591.
- Dodgson, S. J., Shank, R. P., & Maryanoff, B. E. (2000).** Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia*, 41(4 SUPPL.). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb06047.x>
- Terunuma, M. (2018).** Diversity of structure and function of GABA B receptors: a complexity of GABA B -mediated signaling. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 94, 390–411.
- Eyal, S., Yagen, B., Sobol, E., Altschuler, Y., Shmuel, M., & Bialer, M. (2004).** The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia*, 45(7), 737–744. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.00104.x>
- Felder, C. C. (1995).** Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *The FASEB Journal*, 9(8), 619–625. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768353>
- Ferguson, B. R., & Gao, W. J. (2018).** Pv interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, 12(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>
- Ferini-Strambi, L., Sansoni, V., & Combi, R. (2012).** Nocturnal frontal lobe epilepsy and the acetylcholine receptor. *Neurologist*, 18(6), 343–349. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31826a99b8>
- Frigerio, F., Chaffard, G., Berwaer, M., & Maechler, P. (2006).** The antiepileptic drug topiramate preserves metabolism-secretion coupling in insulin secreting cells chronically exposed to the fatty acid oleate. *Biochemical Pharmacology*, 72(8), 965–973. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.013>
- Gao, Z., Zhang, J., Kheterpal, I., Kennedy, N., Davis, R. J., & Ye, J. (2011).** Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22227–22234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.228874>
- Gerhart-Hines, Z., Dominy, J. E., Blättler, S. M., Jedrychowski, M. P., Banks, A. S., Lim, J. H., ... Puigserver, P. (2011).** The cAMP/PKA Pathway Rapidly Activates SIRT1 to Promote Fatty Acid Oxidation Independently of Changes in NAD<sup>+</sup>. *Molecular Cell*, 44(6), 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.005>
- Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G. T. T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M., & Steegborn, C. (2013).** Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.1303628110>

- Ghorbel MT, Becker KG, Henley JM (2005):** Profile of changes in gene expression in cultured hippocampal neurones evoked by the GABAB receptor agonist baclofen. *Physiol Genomics*. 2005 Jun 16;22(1):93-8. doi: 10.1152/physiolgenomics.00202.2004.
- Gibbs, J. W., Sombati, S., Delorenzo, R. J., & Coulter, D. A. (2000).** Cellular actions of topiramate: Blockade of kainate-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1), 10–16. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02164.x>
- Goodman, C. A., & Hornberger, T. A. (2013).** Measuring protein synthesis with SUnSET: A valid alternative to traditional techniques? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 41(2), 107–115. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182798a95>
- Gordey, M., DeLorey, T. M., & Olsen, R. W. (2000).** Differential sensitivity of recombinant GABAA receptors expressed in xenopus oocytes to modulation by topiramate. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02167.x>
- Gould, J., Reeve, H. L., Vaughan, P. F. T., & Peers, C. (1992).** Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Neuroscience Letters*, 145(2), 201–204. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90022-Y](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90022-Y)
- Gregory, P. D., Wagner, K., & Hörz, W. (2001).** Histone acetylation and chromatin remodeling. *Experimental Cell Research*, 265(2), 195–202. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5187>
- Grudt, T. J., Usowicz, M. M., & Henderson, G. (1996).** Ca<sup>2+</sup> entry following store depletion in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research*, 36(95).
- Gryder, D. S., & Rogawski, M. A. (2003).** Selective antagonism of GluR5 kainate-receptor-mediated synaptic currents by topiramate in rat basolateral amygdala neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(18), 7069–7074. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-18-07069.2003>
- Gurkoff G, Shahlaie K, Lyeth B, Berman R. (2013)** Voltage-gated calcium channel antagonists and traumatic brain injury. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Jun 26;6(7):788-812. doi: 10.3390/ph6070788.
- Guo, W., Qian, L., Zhang, J., Zhang, W., Morrison, A., Hayes, P., ... Zhao, J. (2011).** Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *Journal of Neuroscience Research*, 89(11), 1723–1736. <https://doi.org/10.1002/jnr.22725>
- Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. (2010).** Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(5), 253–295. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>
- He, H. Y., & Cline, H. T. (2019).** What Is Excitation/Inhibition and How Is It Regulated? A Case of the Elephant and the Wisemen. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 10–12. <https://doi.org/10.1177/1179069519859371>
- Herrero, A. I., Del Olmo, N., González-Escalada, J. R., & Solís, J. M. (2002).** Two new actions of topiramate: Inhibition of depolarizing GABAA-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology*, 42(2), 210–220. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00171-X)

- Herskovits AZ, Guarente L. (2014)** SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron*. 2014 Feb 5;81(3):471-83. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.028.
- Imai, S. I., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000).** Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795–800. <https://doi.org/10.1038/35001622>
- Ishfaq, M., Maeta, K., Maeda, S., Natsume, T., Ito, A., & Yoshida, M. (2012).** The role of acetylation in the subcellular localization of an oncogenic isoform of translation factor eIF5A. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(11), 2165–2167. <https://doi.org/10.1271/bbb.120620>
- Jia, Q., Dong, W., Zhang, L., & Yang, X. (2020).** Activating Sirt1 by resveratrol suppresses Nav1.7 expression in DRG through miR-182 and alleviates neuropathic pain in rats. *Channels*, 14(1), 69–78. <https://doi.org/10.1080/19336950.2020.1732003>
- Jing, H., & Lin, H. (2015).** Sirtuins in epigenetic regulation. *Chemical Reviews*, 115(6), 2350–2375. <https://doi.org/10.1021/cr500457h>
- Jones, C. K., Byun, N., & Bubser, M. (2012).** Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 16–42. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.199>
- Kawasaki, H., Tancredi, V., D’Arcangelo, G., & Avoli, M. (199).** Multiple actions of the novel anticonvulsant drug topiramate in the rat subiculum in vitro. *Brain Research*, 807(1–2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00785-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00785-9)
- Kim, D. S., Kwak, S. E., Kim, J. E., Won, M. H., Choi, H. C., Song, H. K., ... Kang, T. C. (2005).** The effect of topiramate on GABAB receptor, vesicular GABA transporter and paired-pulse inhibition in the gerbil hippocampus. *Neuroscience Research*, 53(4), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.08.015>
- King, J. R., Ullah, A., Bak, E., Saleet Jafri, M., & Kabbani, N. (2018).** Ionotropic and metabotropic mechanisms of allosteric modulation of A7 nicotinic receptor intracellular calcium S. *Molecular Pharmacology*, 93(6), 601–611. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111401>
- Klaassen, A., Glykys, J., Maguire, J., Labarca, C., Mody, I., & Boulter, J. (2006).** Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19152–19157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608215103>
- Korecka, J. A., van Kesteren, R. E., Blaas, E., Spitzer, S. O., Kamstra, J. H., Smit, A. B., ... Bossers, K. (2013).** Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063862>
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013).** Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol.*, 1078, 9–21. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>
- Kröll-Seger, J., Portilla, P., Dulac, O., & Chiron, C. (2006).** Topiramate in the treatment of highly refractory patients with dravet syndrome. *Neuropediatrics*, 37(6), 325–329. <https://doi.org/10.1055/s-2007-964867>



- Kuriyama, K., Hirouchi, M., & Nakayasu, H. (1993).** Structure and function of cerebral GABAA and GABAB receptors. *Neuroscience Research*, 17(2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(93\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0168-0102(93)90087-7)
- Kuzmiski, J. B., Barr, W., Zamponi, G. W., & MacVicar, B. A. (2005).** Topiramate inhibits the initiation of plateau potentials in CA1 neurons by depressing R-type calcium channels. *Epilepsia*, 46(4), 481–489. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.35304.x>
- Lalla, R., & Donmez, G. (2013).** The role of sirtuins in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5(APR), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00016>
- Lambert, D. G., & Nahorski, S. R. (1990).** Muscarinic-receptor-mediated changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. *Biochemical Journal*, 265(2), 555–562. <https://doi.org/10.1042/bj2650555>
- Lavu, S., Boss, O., Elliott, P. J., & Lambert, P. D. (2008).** Sirtuins - Novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(10), 841–853. <https://doi.org/10.1038/nrd2665>
- Le, S. V., Le, P. H. T., Le, T. K. Van, Kieu Huynh, T. T., & Hang Do, T. T. (2017).** A mutation in GABRB3 associated with Dravet syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 173(8), 2126–2131. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38282>
- Liang, Y., Chen, X., Osborne, M., DeCarlo, S. O., Jetton, T. L., & Demarest, K. (2005).** Topiramate ameliorates hyperglycaemia and improves glucose-stimulated insulin release in ZDF rats and db/db mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7(4), 360–369. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2004.00403.x>
- Liang J, Zhou X, Wang J, Fei ZY, Qin GC, Zhang DK, Zhou JY, Chen LX.** Upregulation of silent information regulator 1 alleviates mitochondrial dysfunction in the trigeminal nucleus caudalis in a rat model of chronic migraine. *Neuroreport*. 2021 Jan 13;32(2):144-156. doi: 10.1097/WNR.0000000000001569.
- Lochner, A., & Moolman, J. A. (2006).** The many faces of H89: A review. *Cardiovascular Drug Reviews*, 24(3–4), 261–274. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x>
- Löscher, W., & Schmidt, D. (2006).** Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 47(8), 1253–1284. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00607.x>
- Louis, E. K. S. (2009).** Truly rational polytherapy: maximizing efficacy and minimizing drug interactions, drug load, and adverse effects. *Current Neuropharmacology*, 7(2), 96.
- Lovinger, D. M. (2008).** Communication Networks in the Brain. *Alcohol Research & Health*, 31(No 3). <https://doi.org/10.3109/01443618909151288>
- Lv, C., Hu, H. Y., Zhao, L., Zheng, H., Luo, X. Z., & Zhang, J. (2015).** Intrathecal SRT1720, a SIRT1 agonist, exerts anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects on chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(5), 7152–7159.

- Marder, E., O’Leary, T., & Shruti, S. (2014).** Neuromodulation of circuits with variable parameters: Single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annual Review of Neuroscience*, *37*, 329–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013958>
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2012).** Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>
- McCamphill, P. K., Farah, C. A., Anadolu, M. N., Hoque, S., & Sossin, W. S. (2015).** Bidirectional regulation of eEF2 phosphorylation controls synaptic plasticity by decoding neuronal activity patterns. *Journal of Neuroscience*, *35*(10), 4403–4417. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2376-14.2015>
- McKay, B. E., Placzek, A. N., & Dani, J. A. (2007).** Regulation of Synaptic Transmission and Plasticity by Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Biochem Pharmacol*, *74*(8), 1120–1133. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- McLean, M. J., Bukhari, A. A., & Wamil, A. W. (2000).** Effects of Topiramate on Sodium-Dependent Action-Potential Firing by Mouse Spinal Cord Neurons in Cell Culture. *Epilepsia*, *41*(s1), 21–24. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02166.x>
- Michan, S., & Sinclair, D. (2007).** Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *Biochemical Journal*, *404*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20070140>
- Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., ... Westphal, C. H. (2007).** Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, *450*(7170), 712–716. <https://doi.org/10.1038/nature06261>
- Morris, B. J. (2013).** Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *56*, 133–171. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525>
- Murphy, N. P., Vaughan, P. F. T., Ball, S. G., & McCormack, J. G. (1991).** The Cholinergic Regulation of Intracellular Calcium in the Human Neuroblastoma, SH-SY5Y. *Journal of Neurochemistry*, *57*(6), 2116–2123. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb06430.x>
- Nakamura, J., Tamura, S., Kanda, T., Ishii, A., Ishihara, K., Serikawa, T., ... Sasa, M. (1994).** Inhibition by topiramate of seizures in spontaneously epileptic rats and DBA/2 mice. *European Journal of Pharmacology*, *254*(1–2), 83–89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(94\)90373-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(94)90373-5)
- Nasrin, N., Kaushik, V. K., Fortier, E., Wall, D., Pearson, K. J., de Cabo, R., & Bordone, L. (2009).** JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS ONE*, *4*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008414>
- Nogueiras, R., Habegger, K. M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A. S., Dietrich, M. O., ... Tschöp, M. H. (2012).** Sirtuin 1 and sirtuin 3: Physiological modulators of metabolism. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1479–1514. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>
- Okada, M., Yoshida, S., Zhu, G., Hirose, S., & Kaneko, S. (2005).** Biphasic actions of topiramate on monoamine exocytosis associated with both soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors and Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-releasing systems. *Neuroscience*, *134*(1), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.045>

- Oksvold, M. P., Pedersen, N. M., Forfang, L., & Smeland, E. B. (2012).** Effect of cycloheximide on epidermal growth factor receptor trafficking and signaling. *FEBS Letters*, *586*(20), 3575–3581. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.022>
- Owona, B. A., Zug, C., Schluesener, H. J., & Zhang, Z. Y. (2019).** Amelioration of behavioral impairments and neuropathology by antiepileptic drug topiramate in a transgenic Alzheimer's disease model mice, APP/PS1. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms20123003>
- Oyrer, J., Maljevic, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Petrou, S., & Reid, C. A. (2018).** Ion channels in genetic epilepsy: From genes and mechanisms to disease-targeted therapies. *Pharmacological Reviews*, *70*(1), 142–173. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014456>
- Palmieri, C., Kawasaki, H., & Avoli, M. (2000).** Topiramate depresses carbachol-induced plateau potentials in subicular bursting cells. *NeuroReport*, *11*(1), 75–78. <https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00015>
- Papouin, T., & Haydon, P. (2018).** Correction: Obtaining Acute Brain Slices. *Bio-Protocol*, *8*(13). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2945>
- Paz, J. T., & Huguenard, J. R. (2015).** Microcircuits and their interactions in epilepsy: Is the focus out of focus? *Nature Neuroscience*, *18*(3), 351–359. <https://doi.org/10.1038/nn.3950>
- Picciotto, M. R. (2012).** Acetylcholine as a neuromodulator. *Neuron*, *76*(1), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>. Acetylcholine
- Poulsen, C. F., Simeone, T. A., Maar, T. E., Smith-Swintosky, V., White, H. S., & Schousboe, A. (2004).** Modulation by Topiramate of AMPA and Kainate Mediated Calcium Influx in Cultured Cerebral Cortical, Hippocampal and Cerebellar Neurons. *Neurochemical Research*, *29*(1), 275–282. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000010456.92887.3b>
- Pozo, K., & Goda, Y. (2010).** Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* *66*(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.028>
- Purves, G. I., Kamishima, T., Davies, L. M., Quayle, J. M., & Dart, C. (2009).** Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Physiology*, *587*(14), 3639–3650. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173534>
- Qian, J., & Noebels, J. L. (2003).** Topiramate alters excitatory synaptic transmission in mouse hippocampus. *Epilepsy Research*, *55*(3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(03)00120-7)
- Raccuglia, D., & Mueller, U. (2014).** Temporal integration of cholinergic and gabaergic inputs in isolated insect mushroom body neurons exposes pairing-specific signal processing. *Journal of Neuroscience*, *34*(48), 16086–16092. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0714-14.2014>
- Raskin, P., Donofrio, P. D., Rosenthal, N. R., Hewitt, D. J., Jordan, D. M., Xiang, J., & Vinik, A. I. (2004).** Topiramate vs placebo in painful diabetic neuropathy: Analgesic and metabolic effects. *Neurology*, *63*(5), 865–873. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000137341.89781.14>

- Ridley, D. L., Pakkanen, J., & Wonnacott, S. (2002).** Effects of chronic drug treatments on increases in intracellular calcium mediated by nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells. *British Journal of Pharmacology*, *135*(4), 1051–1059. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704508>
- Sachdeo, R. C. (1998).** Topiramate: Clinical profile in epilepsy. *Clinical Pharmacokinetics*, *34*(5), 335–346. <https://doi.org/10.2165/00003088-199834050-00001>
- Sadana, R., & Dessauer, C. W. (2009).** Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: Insights from knockout and overexpression studies. *NeuroSignals*, *17*(1), 5–22. <https://doi.org/10.1159/000166277>
- Sampieri, C. L., Nuttall, R. K., Young, D. A., Goldspink, D., Clark, I. M., & Edwards, D. R. (2008).** Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes. *Matrix Biology*, *27*(2), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.09.004>
- Sasaki, T., Maier, B., Koclega, K. D., Chruszcz, M., Gluba, W., Stukenberg, P. T., ... Scoble, H. (2008).** Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS ONE*, *3*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004020>
- Schanzenbächer CT, Sambandan S, Langer JD, Schuman EM (2016).** Nascent Proteome Remodeling following Homeostatic Scaling at Hippocampal Synapses. *Neuron*. 2016 Oct 19;92(2):358-371. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.058.
- Schiffer, W. K., Gerasimov, M. R., Marsteller, D. A., Geiger, J., Barnett, C., Alexoff, D. L., & Dewey, S. L. (2001).** Topiramate selectively attenuates nicotine-induced increases in monoamine release. *Synapse*, *42*(3), 196–198. <https://doi.org/10.1002/syn.10000>
- Schug, T. T., & Li, X. (2011).** Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. *Annals of Medicine*, *43*(3), 198–211. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.547211>
- Schulz, D. J. (2006).** Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: It's what's inside that counts. *Journal of Experimental Biology*, *209*(24), 4821–4827. <https://doi.org/10.1242/jeb.02567>
- Shank, R. P., Gardocki, J. F., Vaught, J. L., Davis, C. B., Schupsky, J. J., Raffa, R. B., ... Maryanoff, B. E. (1994).** Topiramate: Preclinical Evaluation of a Structurally Novel Anticonvulsant. *Epilepsia*, *35*(2), 450–460. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1994.tb02459.x>
- Shank, R. P., Dose, D. R., Streeter, A. J., & Bialer, M. (2005).** Plasma and whole blood pharmacokinetics of topiramate: The role of carbonic anhydrase. *Epilepsy Research*, *63*(2–3), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2005.01.001>
- Shank, R. P., & Maryanoff, B. E. (2008).** Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, *14*(2), 120–142. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2008.00041.x>
- Shao, H., Xue, Q., Zhang, F., Luo, Y., Zhu, H., Zhang, X., ... Yu, B. (2014).** Spinal SIRT1 activation attenuates neuropathic pain in mice. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100938>

- Shao, L.-R., Habela, C. W., & Stafstrom, C. E. (2019).** Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance. *Children*, 6(2), 23. <https://doi.org/10.3390/children6020023>
- Shifrin, V. I., & Anderson, P. (1999).** Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13985–13992. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13985>
- Simeone, T. A., Wilcox, K. S., & White, H. S. (2006).** Subunit selectivity of topiramate modulation of heteromeric GABAA receptors. *Neuropharmacology*, 50(7), 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.12.006>
- Siniscalchi, A., Gallelli, L., Marigliano, N. M., Orlando, P., & De Sarro, G. (2007).** Use of topiramate for glossodynia. *Pain Medicine*, 8(6), 531–534. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2006.00152.x>
- Sirven, J. I. (2015).** Epilepsy: A Spectrum Disorder. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9), a022848. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022848>
- Skradski, S., & White, H. S. (2000).** Topiramate blocks kainate-evoked cobalt influx into cultured neurons. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1), 45–47. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02171.x>
- Smith, L., Price-Jones, M., Hughes, K., Egebjerg, J., Poulsen, F., Wiberg, F. C., & Shank, R. P. (2000).** Effects of topiramate on kainate- and domoate-activated [<sup>14</sup>C]guanidinium ion flux through GluR6 channels in transfected BHK cells using cyostar-T scintillating microplates. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02172.x>
- Sombati, S., & DeLorenzo, R. J. (1995).** Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. *Journal of Neurophysiology*, 73(4), 1706–1711. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.4.1706>
- Ster, J., De Bock, F., Guérineau, N. C., Janossy, A., Barrère-Lemaire, S., Bos, J. L., ... Fagni, L. (2007).** Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2519–2524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611031104>
- Stone SE, Glenn WS, Hamblin GD, Tirrell DA (2017).** Cell-selective proteomics for biological discovery. *Curr Opin Chem Biol*. 2017 Feb;36:50-57. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.12.026. Epub 2017 Jan 12.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., & Zhai, Q. (2007).** SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell Metabolism*, 6(4), 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.014>
- Taha, E., Gildish, I., Gal-Ben-Ari, S., & Rosenblum, K. (2013).** The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.04.015>
- Tai, C., Abe, Y., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2014).** Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet

- syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 3139–3148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411131111>
- Tai, C., Kuzmiski, J. B., & MacVicar, B. A. (2006).** Muscarinic enhancement of R-type calcium currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(23), 6249–6258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1009-06.2006>
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007).** Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6823–6832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609554200>
- Tatti, R., Haley, M. S., Swanson, O. K., Tselha, T., & Maffei, A. (2017).** Neurophysiology and Regulation of the Balance Between Excitation and Inhibition in Neocortical Circuits. *Biological Psychiatry*, 81(10), 821–831. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.09.017>
- Treiman, M., Caspersen, C., & Christensen, S. B. (1998).** A tool coming of age: Thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(4), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01184-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01184-5)
- Turrigiano, G. (2011).** Too Many Cooks? Intrinsic and Synaptic Homeostatic Mechanisms in Cortical Circuit Refinement. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 89–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153238>
- van Loo, K. M. J., & Becker, A. J. (2020).** Transcriptional Regulation of Channelopathies in Genetic and Acquired Epilepsies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00587>
- Verstraelen, P., Pintelon, I., Nuydens, R., Cornelissen, F., Meert, T., & Timmermans, J. P. (2014).** Pharmacological characterization of cultivated neuronal networks: Relevance to synaptogenesis and synaptic connectivity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(5), 757–776. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0057-6>
- Verstraelen, P., Van Dyck, M., Verschuuren, M., Kashikar, N. D., Nuydens, R., Timmermans, J. P., & De Vos, W. H. (2018).** Image-based profiling of synaptic connectivity in primary neuronal cell culture. *Frontiers in Neuroscience*, 12(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00389>
- Vikram, A., Lewarchik, C. M., Yoon, J., Naqvi, A., Liu, J., Gabani, M., ... Guan, X. (2018).** *HHS Public Access*. 23(3), 361–367. <https://doi.org/10.1038/nm.4284.Sirtuin1>
- Villa, C., Colombo, G., Meneghini, S., Gotti, C., Moretti, M., Ferini-Strambi, L., ... Combi, R. (2019).** CHRNA2 and nocturnal frontal lobe epilepsy: Identification and characterization of a novel loss of function mutation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00017>
- Wahab, A. (2010).** Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2090–2110. <https://doi.org/10.3390/ph3072090>
- Wang, J., Lin, Z. J., Liu, L., Xu, H. Q., Shi, Y. W., Yi, Y. H., ... Liao, W. P. (2017).** Epilepsy-associated genes. *Seizure*, 44, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.030>

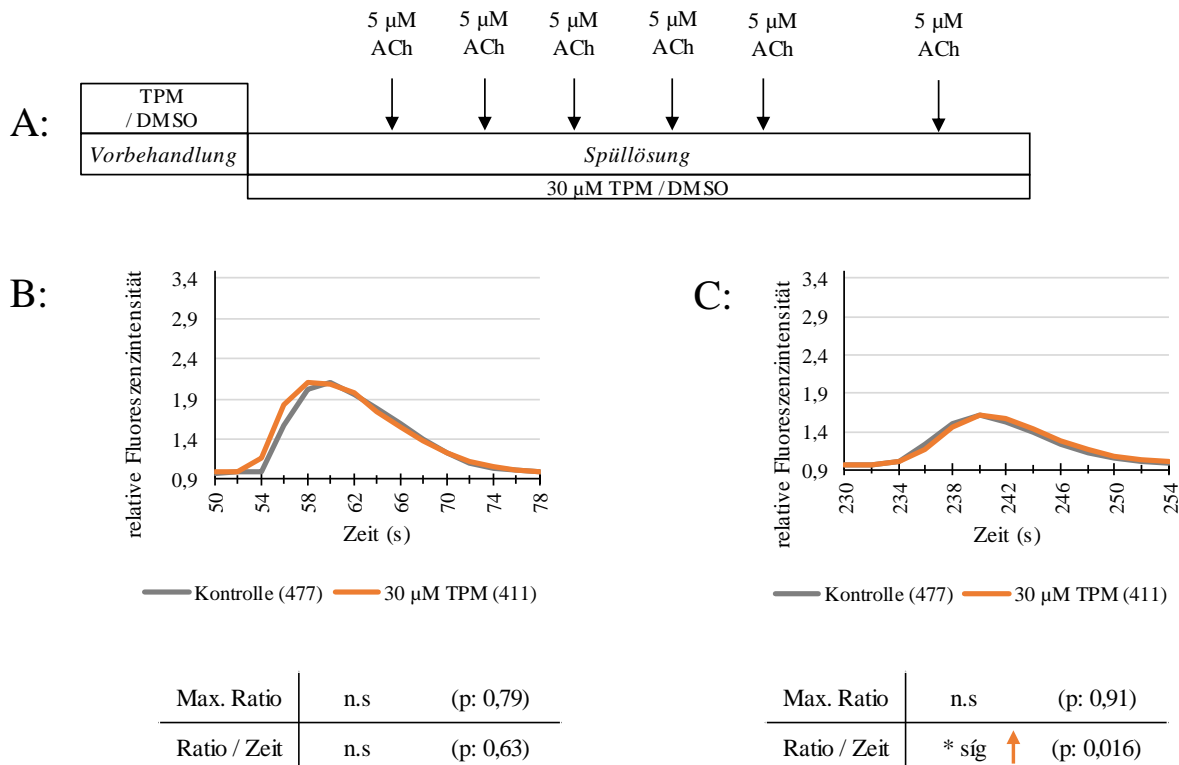
- Wang, W., Li, F., Xu, Y., Wei, J., Zhang, Y., Yang, H., ... Fang, D. (2018).** JAK1-mediated Sirt1 phosphorylation functions as a negative feedback of the JAK1-STAT3 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 293(28), 11067–11075. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001387>
- Wauquier, A., & Zhou, S. (1996).** Topiramate: A potent anticonvulsant in the amygdala-kindled rat. *Epilepsy Research*, 24(2), 73–77. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00105-0](https://doi.org/10.1016/0920-1211(95)00105-0)
- Wen, L., Chen, Z., Zhang, F., Cui, X., Sun, W., Geary, G. G., ... Shyy, J. Y. J. (2013).** Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  phosphorylation of Sirtuin 1 in endothelium is atheroprotective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1309354110>
- White, H. S., Brown, S. D., Woodhead, J. H., Skeen, G. A., & Wolf, H. H. (1997).** Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Research*, 28(3), 167–179. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(97)00045-4)
- White, H. S., Brown, S. D., Woodhead, J. H., Skeen, G. A., & Wolf, H. H. (2000).** Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia*, 41(SUPPL. 1), 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02165.x>
- White, H. S., Smith, M. D., & Wilcox, K. S. (2007).** Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *International Review of Neurobiology*, 81(06), 85–110. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)81006-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)81006-8)
- Wieser, H. G., & Silfvenius, H. (2000).** An overview of the preclinical aspects of topiramate: Pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia*, 41(4 SUPPL.). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb01538.x>
- Wilkes, J. J., Audrey Nguyen, M. T., Bandyopadhyay, G. K., Nelson, E., & Olefsky, J. M. (2005 a).** Topiramate treatment causes skeletal muscle insulin sensitization and increased Acrp30 secretion in high-fat-fed male Wistar rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 289(6), 1015–1022. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00169.2005>
- Wilkes, J. J., Nelson, E., Osborne, M., Demarest, K. T., & Olefsky, J. M. (2005 b).** Topiramate is an insulin-sensitizing compound in vivo with direct effects on adipocytes in female ZDF rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(3 51-3), 617–624. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00437.2004>
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017).** The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
- Xing, A., Li, X., Jiang, C., Chen, Y., Wu, S., Zhang, J., & An, L. (2019).** As a Histone Deacetylase Inhibitor,  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Upregulates GluR2 Expression: An In Vitro and In Vivo Study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(17), e1900001. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900001>
- Yang, X. J., & Seto, E. (2008).** Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications. *Molecular Cell*, 31(4), 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.002>

- Zarubin, T., & Han, J. (2005).** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, *15*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290257>
- Zhang, Q., Zeng, S. X., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, D., Ye, Q., ... Lu, H. (2012).** A small molecule Inauhzin inhibits SIRT1 activity and suppresses tumour growth through activation of p53. *EMBO Molecular Medicine*, *4*(4), 298–312. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100211>
- Zhang, X. L., Velumian, A. A., Jones, O. T., & Carlen, P. L. (2000).** Modulation of high-voltage - Activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia*, *41*(SUPPL. 1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.2000.tb02173.x>
- Zhang, Y., Zhang, Q., Zeng, S. X., Mayo, L. D., & Lu, H. (2012).** Inauhzin and Nutlin3 synergistically activate p53 and suppress tumor growth. *Cancer Biology & Therapy*, *13*:10, 915–924.
- Zhang, Z., Shen, Q., Wu, X., Zhang, D., & Xing, D. (2020).** Activation of PKA/SIRT1 signaling pathway by photobiomodulation therapy reduces A $\beta$  levels in Alzheimer's disease models. *Aging Cell*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/accel.13054>
- Zhen, X., Uryu, K., Wang, H. Y., & Friedman, E. (1998).** D1 dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen- activated protein kinase and c-Jun amino-terminal kinase by a protein kinase A-dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*, *54*(3), 453–458. <https://doi.org/10.1124/mol.54.3.453>
- Zona, C., Ciotti, M. T., & Avoli, M. (1997).** Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters*, *231*(3), 123–126. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00543-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00543-0)
- Zschoernig, B., & Mahlkecht, U. (2008).** SIRTUIN 1: Regulating the regulator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *376*(2), 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.137>



## 9 Anhang

### 9.1 Ergänzende Calcium-Imaging Experimente



**Abbildung A-1: Die Vorbehandlung der SHSY-5Y Zellen mit 30  $\mu$ M TPM über 24 h beeinflusst ACh-induzierte Calciumsignale während der multiplen Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh nur schwach**

**A:** Schematischer Ablauf der Messungen während der Messung. 30  $\mu$ M TPM (Kontrolle: 0,06% DMSO) wurde 24 Stunden vor und während der Messung auf den Zellen inkubiert. Während der Messung wurden die Zellen nach dem Standard-Stimulationsprotokoll 6x stimuliert.

**B, C:** Zeitlicher Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der Neurone nach der ersten und sechsten Stimulation mit 5  $\mu$ M ACh, dargestellt als Median der zeitlichen Kurvenverläufe aller Zellen der entsprechenden Vorbehandlung. Zellzahl in Klammern. Anzahl unabhängiger Experimente: Kontrolle n = 8, 30  $\mu$ M TPM n = 8. Statistische Auswertung von max. Ratio und Ratio/Zeit mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. „\* sig“ = beide Gruppen unterscheiden sich signifikant, p-Werte in Klammern.

## 9.2 Calcium-Imaging Statistik

Tabelle A-1: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung A-1

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	30 $\mu$ M TPM	Kontrolle	30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	477	411	477	411
	Min	1,16	1,11	1,04	1,05
	Q1	1,76	1,79	1,42	1,40
	Median	2,17	2,19	1,69	1,70
	Q3	2,84	2,84	2,17	2,20
	Max	5,96	8,30	4,90	5,13
	Mittlerer Rang	442,42	446,91	444,83	443,03
	Rangsumme	211035,5	183680,5	211739,5	182088,5
	U	97032,5		98213,5	
	Z	-0,259		0,10	
	P-Wert	0,79		0,91	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	477	411	477	411
	Min	0,19	0,12	-0,56	0,14
	Q1	0,58	0,56	0,54	0,52
	Median	0,77	0,78	0,73	0,79
	Q3	1,10	1,22	1,07	1,31
	Max	4,16	3,89	3,38	4,90
	Mittlerer Rang	439,66	447,95	454,98	4,98
	Rangsumme	209279,5	183661,5	216572,5	237055,5
	U	95753,5		10,046,5	
	Z	-0,48		-2,41	
	P-Wert	0,63		0,015	

Tabelle A-2: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 18

		Undifferenzierte Zellen		Differenzierte Zellen	
		Kontrolle	30 $\mu$ M TPM	Kontrolle	30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	938	713	402	322
	Min	1,02	1,03	1,04	1,06
	Q1	1,13	1,14	1,12	1,13
	Median	1,22	1,24	1,19	1,20
	Q3	1,37	1,41	1,28	1,32
	Max	2,62	3,95	2,33	2,69
	Mittlerer Rang	797,29	863,75	346,43	383,73
	Rangsumme	747866,5	615859,5	139612	123563
	U	307475		58206	
	Z	-2,80		-2,38	
	P-Wert	0,005		0,017	

Tabelle A-3: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 24

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	30 $\mu$ M TPM	Kontrolle	30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	427	431	427	431
	Min	1,12	1,17	1,07	1,04
	Q1	1,55	1,64	1,36	1,40
	Median	2,05	2,08	1,66	1,70
	Q3	2,82	2,71	2,31	2,22
	Max	6,44	7,61	5,18	4,50
	Mittlerer Rang	423,62	435,32	428,48	432,5
	Rangsumme	180886,0	187625,0	183821	186409
	U	89508		91586	
	Z	0,69		-0,23	
	P-Wert	0,48		0,81	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	427	431	427	431
	Min	0,25	0,18	0,16	0,17
	Q1	0,55	0,56	0,52	0,53
	Median	0,74	0,76	0,72	0,69
	Q3	1,10	1,05	1,05	1,01
	Max	5,55	4,38	3,22	3,00
	Mittlerer Rang	430,85	427,15	433,74	427,27
	Rangsumme	183975	183678	186076,5	184153,5
	U	92597		93841,5	
	Z	0,21		0,38	
	P-Wert	0,82		0,70	

Tabelle A-4: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 25

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	30 $\mu$ M TPM (ACh)	Kontrolle	30 $\mu$ M TPM (ACh)
Max. Ratio	Anzahl Zellen	351	341	351	341
	Min	1,20	1,15	1,06	1,00
	Q1	1,79	2,00	1,50	1,64
	Median	2,41	2,57	1,93	2,33
	Q3	3,14	3,60	2,47	3,05
	Max	6,73	7,50	4,94	6,02
	Mittlerer Rang	326,58	367,01	308,66	385,45
	Rangsumme	114628,0	125150,0	108339,5	131438,5
	U	52852		46563,5	
	Z	-2,660		-5,052	
	P-Wert	0,008		0,000	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	351	341	351	341
	Min	0,12	0,30	0,17	-0,13
	Q1	0,66	0,72	0,63	0,69
	Median	0,87	1,04	0,80	0,96
	Q3	1,24	1,48	1,19	1,41
	Max	5,58	6,02	4,86	5,00
	Mittlerer Rang	324,23	369,42	315,38	378,53
	Rangsumme	113804,5	125973,5	110699,5	129078,5
	U	52028,50		48923,5	
	Z	-2,973		-4,154	
	P-Wert	0,003		0,000	

Tabelle A-5: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 26

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	30 $\mu$ M TPM (Nik)	Kontrolle	30 $\mu$ M TPM (Nik)
Max. Ratio	Anzahl Zellen	328	246	328	246
	Min	1,00	1,16	1,02	1,03
	Q1	1,28	1,32	1,16	1,19
	Median	1,40	1,44	1,27	1,31
	Q3	1,61	1,67	1,46	1,44
	Max	3,72	3,89	2,75	2,01
	Mittlerer Rang	274,92	304,27	275,64	303,31
	Rangsumme	90174,5	74850,5	90410,0	74615,0
	U	36218,5		36454	
	Z	-2,098		-1,978	
P-Wert	0,036		0,048		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	328	246	328	246
	Min	-0,52	-0,05	-0,55	-0,51
	Q1	0,35	0,40	0,35	0,35
	Median	0,44	0,46	0,41	0,42
	Q3	0,54	0,54	0,49	0,48
	Max	1,23	1,30	1,18	1,09
	Mittlerer Rang	270,84	306,17	282,83	293,73
	Rangsumme	88294	75012	92767	72258
	U	34993		38811	
	Z	-2,533		-0,779	
P-Wert	0,011		0,436		

Tabelle A-6: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 27

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	50 $\mu$ M GABA	Kontrolle	50 $\mu$ M GABA
Max. Ratio	Anzahl Zellen	253	412	253	412
	Min	1,11	1,15	1,05	1,02
	Q1	1,55	1,53	1,21	1,18
	Median	1,84	1,87	1,37	1,31
	Q3	2,33	2,36	1,66	1,53
	Max	5,66	6,56	4,19	3,86
	Mittlerer Rang	336,65	330,76	362,13	315,11
	Rangsumme	85172,00	136273,00	91619,00	129826,00
	U	53041		59488	
	Z	0,384		3,064	
	P-Wert	0,701		0,002	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	253	412	253	412
	Min	0,21	0,11	-0,35	-0,37
	Q1	0,44	0,42	0,40	0,39
	Median	0,61	0,59	0,52	0,54
	Q3	0,88	0,83	0,79	0,68
	Max	5,36	4,28	3,90	2,61
	Mittlerer Rang	344,59	325,88	339,18	329,21
	Rangsumme	87180,50	134264,50	85812,00	135633,00
	U	55049,5		53681	
	Z	1,219		0,650	
	P-Wert	0,223		0,516	

Tabelle A-7: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 28

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	50 $\mu$ M GABA+ 30 $\mu$ M TPM	Kontrolle	50 $\mu$ M GABA+ 30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	620	482	620	482
	Min	1,23	1,10	1,03	1,01
	Q1	1,84	1,67	1,37	1,28
	Median	2,47	2,22	1,78	1,59
	Q3	3,37	3,18	2,23	2,11
	Max	7,04	6,71	4,98	4,71
	Mittlerer Rang	575,36	520,81	581,97	512,30
	Rangsumme	356722,5	251030,5	360823,0	246930,0
	U	164212,5		168313	
	Z	2,822		3,605	
	P-Wert	0,005		0,000	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	620	482	620	482
	Min	0,15	0,08	-0,35	-1,01
	Q1	0,49	0,50	0,42	0,41
	Median	0,81	0,78	0,63	0,59
	Q3	1,24	1,31	0,93	0,90
	Max	6,30	6,16	3,98	3,60
	Mittlerer Rang	552,22	550,58	555,54	546,31
	Rangsumme	342374,0	265379,0	344432,0	263321,0
	U	149864		151922	
	Z	0,085		0,477	
	P-Wert	0,933		0,633	



Tabelle A-8: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 30

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	10 $\mu$ M RP-cAMPs	Kontrolle	10 $\mu$ M RP-cAMPs
Max. Ratio	Anzahl Zellen	492	441	492	441
	Min	1,14	1,16	1,07	1,06
	Q1	2,22	2,09	1,51	1,43
	Median	2,99	2,83	1,94	1,75
	Q3	3,81	3,64	2,44	2,22
	Max	7,33	7,31	4,74	5,35
	Mittlerer Rang	482,90	449,26	493,42	436,40
	Rangsumme	237586,0	198125,0	242762,5	192015,5
	U	116308,0		121484,5	
	Z	1,903		3,228	
P-Wert	0,057		0,001		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	492	441	492	441
	Min	0,15	0,13	0,17	0,20
	Q1	0,66	0,62	0,45	0,49
	Median	0,99	0,97	0,63	0,66
	Q3	1,39	1,41	0,86	0,95
	Max	4,04	3,65	2,37	2,17
	Mittlerer Rang	472,54	460,82	447,40	487,86
	Rangsumme	232488,0	203223,0	220121,5	214656,5
	U	111210,0		98843,5	
	Z	0,663		-2,290	
P-Wert	0,508		0,022		

Tabelle A-9: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 30

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	0,5 $\mu$ M TSA	Kontrolle	0,5 $\mu$ M TSA
Max. Ratio	Anzahl Zellen	235	420	235	420
	Min	1,11	1,14	1,01	1,02
	Q1	1,55	1,65	1,29	1,34
	Median	2,20	2,24	1,62	1,70
	Q3	2,93	3,26	2,25	2,33
	Max	5,99	8,46	4,37	5,02
	Mittlerer Rang	313,13	334,69	318,23	333,47
	Rangsumme	72960,0	140571,0	74784,0	140056,0
	U	45699		47054	
	Z	-1,399		-0,988	
P-Wert	0,162		0,323		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	235	420	235	420
	Min	0,17	0,20	-1,01	-1,25
	Q1	0,53	0,49	0,47	0,45
	Median	0,87	0,83	0,67	0,63
	Q3	1,34	1,37	1,23	1,04
	Max	4,64	4,83	2,90	3,36
	Mittlerer Rang	336,30	321,84	343,93	319,09
	Rangsumme	78359	135172	80823	134017
	U	51098		53093	
	Z	0,939		1,611	
P-Wert	0,348		0,107		

Tabelle A-10: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 31

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		10 $\mu$ M RP-cAMPs	10 $\mu$ M RP-cAMPs + 30 $\mu$ M TPM	10 $\mu$ M RP- cAMPs	10 $\mu$ M RP-cAMPs + 30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	908	915	908	915
	Min	1,02	1,16	1,01	1,05
	Q1	1,91	1,80	1,36	1,35
	Median	2,61	2,42	1,66	1,66
	Q3	3,61	3,34	2,21	2,22
	Max	6,88	8,17	4,56	5,43
	Mittlerer Rang	952,62	872,64	910,33	914,66
	Rangsumme	865936,0	798464,0	827487,5	836912,5
	U	452341,0		413892,5	
	Z	3,243		-0,176	
	P-Wert	0,001		0,861	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	908	915	908	915
	Min	-1,02	0,17	-0,19	-0,33
	Q1	0,53	0,56	0,44	0,46
	Median	0,88	0,79	0,60	0,62
	Q3	1,28	1,24	0,87	0,91
	Max	5,73	5,52	3,66	3,46
	Mittlerer Rang	923,35	901,72	886,90	937,93
	Rangsumme	839322,5	825077,5	806196,0	858204,0
	U	425727,5		392601,0	
	Z	0,877		-2,069	
	P-Wert	0,381		0,039	

Tabelle A-11: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 32

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	0,5 $\mu$ M TSA + 30 $\mu$ M TPM	Kontrolle	0,5 $\mu$ M TSA + 30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	534	425	534	425
	Min	1,02	1,08	1,01	1,04
	Q1	1,65	1,67	1,26	1,34
	Median	2,30	2,34	1,68	1,72
	Q3	3,27	3,25	2,38	2,45
	Max	8,22	7,60	5,70	5,41
	Mittlerer Rang	475,34	485,86	466,54	496,91
	Rangsumme	253829,5	206490,5	249133,5	211186,5
	U	110984,5		106288,5	
	Z	-0,584		-1,686	
	P-Wert	0,559		0,092	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	534	425	534	425
	Min	-0,13	0,14	-1,01	-1,09
	Q1	0,55	0,65	0,46	0,58
	Median	0,92	1,02	0,73	0,85
	Q3	1,49	1,70	1,14	1,33
	Max	7,50	7,60	4,14	4,53
	Mittlerer Rang	458,04	507,59	450,17	517,48
	Rangsumme	244596,0	215724,0	240389,5	219930,5
	U	101751		97544,5	
	Z	-2,751		-3,739	
	P-Wert	0,006		0,000	

Tabelle A-12: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 34

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	0,2 $\mu$ M Inauhzin	Kontrolle	0,2 $\mu$ M Inauhzin
Max. Ratio	Anzahl Zellen	452	493	452	493
	Min	1,09	1,18	1,04	1,03
	Q1	1,55	1,63	1,32	1,30
	Median	2,09	2,14	1,64	1,61
	Q3	2,91	2,93	2,11	2,09
	Max	7,47	7,69	4,35	6,01
	Mittlerer Rang	464,76	480,55	481,70	465,02
	Rangsumme	210073,0	236912,0	217729,5	229255,5
	U	107695		115351,5	
	Z	-0,888		0,938	
	P-Wert	0,374		0,348	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	452	493	452	493
	Min	0,11	0,11	-0,65	-0,55
	Q1	0,49	0,48	0,47	0,45
	Median	0,72	0,70	0,64	0,65
	Q3	1,25	1,09	0,98	1,06
	Max	6,12	6,33	3,87	3,57
	Mittlerer Rang	487,70	459,52	478,51	467,95
	Rangsumme	220439,5	226545,5	216285,0	230700,0
	U	118061,5		113907	
	Z	1,585		0,594	
	P-Wert	0,113		0,553	

Tabelle A-13: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 35

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		0,2 $\mu$ M Inauhzin	0,2 $\mu$ M Inauhzin + 30 $\mu$ M TPM	0,2 $\mu$ M Inauhzin	0,2 $\mu$ M Inauhzin + 30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	412	501	412	501
	Min	1,13	1,14	1,04	1,05
	Q1	1,57	1,38	1,40	1,20
	Median	2,09	1,70	1,67	1,35
	Q3	2,86	2,21	2,24	1,65
	Max	7,32	5,45	4,91	3,96
	Mittlerer Rang	528,44	398,25	553,25	377,85
	Rangsumme	217719	199522	227939	189302
	U	132641		142861	
	Z	7,423		10,001	
P-Wert	0,000		0,000		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	412	501	412	501
	Min	0,14	0,18	-0,22	-1,10
	Q1	0,52	0,46	0,49	0,45
	Median	0,78	0,67	0,70	0,60
	Q3	1,33	0,94	1,19	0,83
	Max	7,32	5,45	4,09	3,96
	Mittlerer Rang	499,74	421,86	499,27	422,24
	Rangsumme	205891	211350	205701	211540
	U	120813		120623	
	Z	4,44		4,39	
P-Wert	0,00		0,00		

Tabelle A-14: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 37

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	2 $\mu$ M ActD	Kontrolle	2 $\mu$ M ActD
Max. Ratio	Anzahl Zellen	566	387	566	387
	Min	1,16	1,13	1,11	1,07
	Q1	2,04	2,47	1,56	1,87
	Median	2,61	3,26	1,94	2,34
	Q3	3,42	4,21	2,41	2,97
	Max	7,96	8,49	5,88	6,07
	Mittlerer Rang	426,60	549,36	418,97	561,87
	Rangsumme	241026,5	212601,5	237135,5	217445,5
	U	81131,5		76674,5	
	Z	-6,766		-7,871	
	P-Wert	0,000		0,000	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	566	387	566	387
	Min	0,18	0,16	0,18	0,13
	Q1	0,65	0,73	0,52	0,59
	Median	0,90	1,08	0,69	0,85
	Q3	1,34	1,58	1,01	1,20
	Max	4,60	6,65	4,73	3,59
	Mittlerer Rang	448,06	516,90	443,30	526,29
	Rangsumme	253152,0	199524,0	250906,5	203674,5
	U	93257		90445,5	
	Z	-3,795		-4,571	
	P-Wert	0,000		0,000	

Tabelle A-15: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 37

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	Inhibitormix	Kontrolle	Inhibitormix
Max. Ratio	Anzahl Zellen	579	736	580	736
	Min	1,14	1,12	1,00	1,01
	Q1	1,49	1,83	1,11	1,19
	Median	1,91	2,44	1,23	1,41
	Q3	2,35	3,12	1,44	1,69
	Max	4,05	5,10	2,78	2,87
	Mittlerer Rang	528,25	760,07	546,23	746,97
	Rangsumme	305858	559412	316816	549770
	U	137948		148326	
	Z	-10,989		-9,513	
	P-Wert	0,000		0,000	
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	579	736	578	736
	Min	-0,07	-0,06	-1,04	-1,04
	Q1	0,41	0,46	0,29	0,38
	Median	0,63	0,80	0,44	0,58
	Q3	0,89	1,23	0,61	0,79
	Max	2,48	5,07	1,66	2,00
	Mittlerer Rang	584,59	715,75	564,69	730,39
	Rangsumme	338475	526795	326390	537565
	U	170565		159059	
	Z	-6,218		-7,857	
	P-Wert	0,000		0,000	



Tabelle A-16: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 38

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		Kontrolle	1 $\mu$ M Emetin	Kontrolle	1 $\mu$ M Emetin
Max. Ratio	Anzahl Zellen	315	520	315	520
	Min	1,16	1,10	1,09	1,05
	Q1	2,12	2,24	1,60	1,63
	Median	2,77	2,79	1,98	1,91
	Q3	3,51	3,53	2,58	2,44
	Max	6,75	7,83	4,83	5,81
	Mittlerer Rang	404,98	426,71	422,14	415,49
	Rangsumme	127974,5	221891,5	132973,0	216057,0
	U	77888,5		83203,0	
	Z	-1,262		0,386	
P-Wert	0,207		0,700		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	315	520	315	520
	Min	0,18	0,10	0,23	-0,38
	Q1	0,65	0,67	0,57	0,56
	Median	0,94	0,92	0,77	0,74
	Q3	1,28	1,26	1,12	1,03
	Max	4,77	7,83	4,00	4,15
	Mittlerer Rang	418,85	418,29	425,18	413,65
	Rangsumme	132355,5	217510,5	133931,0	215099,0
	U	82269,5		84161,0	
	Z	0,032		0,669	
P-Wert	0,974		0,503		

Tabelle A-17: Deskriptive Statistik und Rangsummenstatistik zu Abbildung 40

		1. Stimulation		6. Stimulation	
		1 $\mu$ M Emetin	1 $\mu$ M Emetin + 30 $\mu$ M TPM	1 $\mu$ M Emetin	1 $\mu$ M Emetin + 30 $\mu$ M TPM
Max. Ratio	Anzahl Zellen	860	820	860	820
	Min	1,06	1,04	1,00	1,01
	Q1	1,89	1,72	1,26	1,19
	Median	2,68	2,35	1,63	1,45
	Q3	3,57	3,13	2,23	1,99
	Max	7,58	6,88	5,94	5,08
	Mittlerer Rang	893,71	784,70	889,92	788,67
	Rangsumme	768588,0	643452,0	765333,0	646707,0
	U	398358		395103	
	Z	4,604		4,276	
P-Wert	0,000		0,000		
Ratio/Zeit	Anzahl Zellen	860	820	860	820
	Min	-0,08	-0,05	-1,01	-0,52
	Q1	0,54	0,52	0,40	0,39
	Median	0,89	0,82	0,63	0,60
	Q3	1,34	1,25	0,90	0,85
	Max	4,79	6,15	4,86	5,04
	Mittlerer Rang	858,30	821,84	858,36	821,77
	Rangsumme	738135	673905	738190	673850
	U	367905		367960	
	Z	1,540		1,545	
P-Wert	0,124		0,122		

### 9.3 ImageJ-Makros

```

for (i = 1; i < nResults; i=i+2) //alle Einträge der Ergebnisliste durchgehen
{
x=getResult("X",i); // X-Koordinate auslesen
y=getResult("Y",i); // Y-Koordinate auslesen
run("Specify...", "width=12 height=12 x=&x y=&y oval centered"); // Kreis mit dem Durchmesser 12 Pixel generieren
roiManager("add"); // zum ROI-Manager hinzufügen
}

```

Abbildung A-16: Quelltext und Erläuterungen des ImageJ Makros zur Erstellung der ROI's aus den X- und Y-Koordinaten aus dem Sussex-PlugIn

```

run ("Set Scale...", "distance=0 known=0 pixel=1 unit=pixel"); // Skalierung auf 0 setzen
run ("Gaussian Blur...", "sigma=2"); // Unschärfefilter anwenden
setAutoThreshold ("Default dark"); // Treshold-Filter "Default" ausführen, Einstellung Over/Under + Dark background
run ("Threshold...");
waitForUser ("Treshold eingeben dann mit OK bestätigen"); // optische Kontrolle des automatisch generierten Treshold
run ("Convert to Mask"); // anwenden
run ("Analyze Particles...", "size=300-Infinity clear add"); // Partikel mit definierter Größe als ROI's hinzufügen

s = getDirectory("Ordner Auswählen"); //Automatischer Speicherdialog mit Ordnerwahl und Dateibeschriftung
title = "unbenannt";
Dialog.create ("Dateiname");
Dialog.addString ("Name:", title);
Dialog.show();
roiManager ("Save", s+"\\"+"RoiSet#"+Dialog.getString()+".zip");
roiManager ("Delete");

```

Abbildung A-17: Quelltext und Erläuterungen des ImageJ Makros zur Markierung von Zellen und Zellkernen

```

nROI=roiManager("count"); //berechnen wir viele ROI's vorliegen
for (i=0; i<nROI;i=i+1)
{
roiManager("Select", i); // für jede ROI „auswählen“ und „löschen“ anwenden
run("Clear", "slice");
}
roiManager ("Deselect");
roiManager ("Delete");

```

Abbildung A-18: Quelltext und Erläuterungen des ImageJ Makros zum Entfernen von ROI Bereichen aus einer Aufnahme

## 10 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uli Müller dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Dissertation anzufertigen. Vielen Dank für die umfassende Betreuung und Unterstützung in den vergangenen vier Jahren und für die vielen anregenden Diskussionen, ohne die die Bearbeitung dieser komplexen Thematik kaum möglich gewesen wäre. Danke auch dafür, dass ich während meiner Promotionszeit so viele verschiedene Gelegenheiten wahrnehmen durfte, meine Ergebnisse auf Fachtagungen und Kongressen anderen Forschern zu präsentieren.

Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. Daniela Yildiz dafür danken, dass sie die Zweitkorrektur dieser Dissertation übernommen hat. Danke auch für die wertvollen Tipps, die mir sehr dabei geholfen haben, meine Gedanken geordnet und hoffentlich verständlich zu Papier zu bringen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Susanne Meuser, die mit ihren Ideen und Vorschlägen immer neue Blickwinkel eröffnet hat und auch sehr oft entscheidend dazu beigetragen hat, dass die Präsentation und Darstellung der Ergebnisse noch besser gelungen ist. Danke auch für die vielen schnellen Korrekturen meines eher gebrochenen Englisch für die verschiedenen Abstracts im Laufe der Jahre. Zudem möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir die Grundlagen der Imkerei und die große Freude an der Arbeit mit Bienen vermittelt hat.

Danke auch an Herrn Dr. Helmut Kallenborn, der mir eine unschätzbare Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Datensätze war. Ich möchte ihm zudem dafür danken, dass ich die letzte Vorlesung seiner Dienstzeit übernehmen durfte und dadurch die Möglichkeit hatte, selbst einmal vor einem Hörsaal mit (mehr oder weniger interessierten) Studenten reden zu dürfen. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, den praktischen Teil des Histologie-Praktikums betreuen zu dürfen, was mir immer sehr viel Spaß gemacht hat.

Zudem möchte ich auch unseren technischen Assistentinnen Iris Fuchs und Marion Schwarz danken. Ohne ihre tatkräftige Hilfe und ihren großen Erfahrungsschatz wäre ich bei der Durchführung vieler meiner Experimente verzweifelt. Danke auch an Michael Glander, ohne dessen umfassendes technisches know-how viele Experimente gar nicht möglich gewesen wären und der immer sofort zur Stelle war, wenn irgendwas mal wieder nicht funktioniert hat. Ohne euch hätte ich niemals so viel lernen können!

Ein großer Dank geht auch an meine Promotionsmitstreiter Sonja, Sandra, Rebecca, Lina und Janick, ohne die sowohl die Arbeitszeit, als auch die Freizeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte. Ich möchte mich für all die Unterstützung und Hilfe bedanken und dafür, dass ich mit ihnen sowohl Freude als auch Leid jederzeit teilen konnte. Danke für die vielen lustigen und einzigartigen Momente, die wir zusammen erlebt haben! In meinen Augen hatten wir eine großartige Zeit, trotz hin und wieder auftretender Rückschläge...

Ein großer Dank geht auch an Michi, der mich während der gesamten Zeit immer unterstützt hat und meine vielen, oft stressgeplagten Launen, ausgehalten hat. Danke für die vielen anregenden Diskussionen und die Hilfe in Bezug auf die Statistik und Datenauswertung und danke für die großartigen Einführungen in die Welt des Programmierens. Zudem möchte ich mich dafür bedanken, dass er immer an mich geglaubt hat und mich immer und immer wieder motiviert hat, meine Ideen und Ziele weiterzuverfolgen.

Auch meiner Mutter möchte ich für ihre Hilfe und Unterstützung in all den Jahren danken. Insbesondere möchte ich ihr dafür danken, dass sie mir immer ihr offenes Ohr geschenkt hat, wenn ich neue Ideen oder Probleme hatte und dass sie immer versucht hat, mir die bestmöglichen Ratschläge mitzugeben. Ohne ihre Unterstützung wäre ich niemals so weit gekommen.

Danke auch an alle, die während meiner Promotionszeit Mitglieder der Arbeitsgruppe waren, die ich aus Platzgründen aber alle gar nicht namentlich aufzählen kann. Danke dafür, dass ihr alle diese Zeit zu etwas ganz Besonderem gemacht habt.

## 11 Lebenslauf und akademischer Werdegang

**Name:** Marie-Luise KümmeI  
**Geboren am:** 10.03.1993  
**Geboren in:** Saarlouis

### Schulische Ausbildung

**1999 – 2003** Grundschule Haustadt  
**2003 – 2011** Albert-Schweitzer-Gymnasium, Dillingen (Saar)

### Hochschulausbildung

**2011 - 2014** Studium der Biologie (Human- und Molekularbiologie)  
Universität des Saarlandes  
Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.), Abschlussnote 2,0

Thema der Bachelorarbeit: „Einfluss der Neurosteroiden Pregnenolon und Pregnenolon-Sulfat auf die Entstehung von Calcium-Signalen in den Kenyonzellen der Honigbiene (*Apis mellifera*) und ihre Auswirkungen auf Lernen und Gedächtnis“. Betreuer: Prof. Dr. Müller

**2014 - 2017** Studium der Biologie (Human- und Molekularbiologie)  
Universität des Saarlandes  
Abschluss: Master of Science (M.Sc.), Abschlussnote 1,1

Thema der Masterarbeit: „Der Einfluss des Antikonvulsivums Topiramamat auf die cholinerge Signaltransduktion in der Honigbiene *Apis mellifera*“. Betreuer: Prof. Dr. Müller

**2017** Beginn der Promotion an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe Zoologie und Neurobiologie, Prof. Dr. Uli Müller

**2017 – 2021** Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Zoologie und Neurobiologie, Prof. Dr. Uli Müller

### Tagungsbeiträge

**2017** **11<sup>th</sup> Göttingen Meeting of Neuroscience Society, Göttingen**

Poster zum Thema: “Closing in on bimodal action of the anticonvulsant Topiramate by employing the honeybee (*Apis mellifera*)”

**ASPET Meeting, Toulouse**

Vortrag zum Thema “Balancing neuronal excitability: role of epigenetic processes”

**28<sup>th</sup> Neurobiological Doctoral Students Workshop, Marburg**

Poster zum Thema “Topiramate – the allrounder in epilepsy treatment used as a tool to understand neuronal self-regulation”

**2018** **11<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Berlin**

Poster zum Thema “Revealing the mechanisms of a balanced neuronal network on single cell level”

**29<sup>th</sup> Neurobiological Doctoral Students Workshop, Berlin**

Poster zum Thema “How do single cells help to maintain a balanced neuronal network?”

**2019** **12<sup>th</sup> Göttingen Meeting of the Neuroscience Society, Göttingen**

Poster zum Thema “Maintaining excitation and inhibition at single cell level”