

Esteban Sanesteban Beceiro
Dr. med.

Influence of the voltage-gated calcium channel β_3 subunit on neuronal cell survival

Fach/Einrichtung: Neurologie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Haas

Das Kalzium-Ion ist an einer Vielzahl von Zellfunktionen in Neuronen beteiligt. Obwohl dieses Ion für die Neuronen lebensnotwendig ist, führt eine Störung seiner Homöostase wie z. B. diejenige, die bei einem übermäßigen Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum geschieht, oft zum Tode der Zelle. Da spannungsabhängige Kalzium-Kanäle eine der wichtigsten Kalziumeintrittspforten der Neuronen darstellen, ist es kaum erstaunlich, dass ihre Blockade das neuronale Überleben in verschiedenen Szenarien erhöht, die mit einem exzessiven Kalzium-Einstrom assoziiert sind wie zum Beispiel in excitotoxischem Hirnschaden, Ischämie, Trauma und neuroinflammatorischen Bedingungen. Diese Kanäle sind Multiproteinkomplexe, die aus einer Pore-formenden α_1 -Untereinheit sowie aus mehreren akzessorischen Untereinheiten (einer, größtenteils extrazellulären $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, einer intrazellulären β -Untereinheit und einer transmembranen γ -Untereinheit) bestehen. Es ist gut bekannt, dass die vier verschiedenen Isoformen der β -Untereinheit die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals positiv beeinflussen und die Zahl der α_1 -Untereinheiten auf der Plasmamembran erhöhen, was insgesamt in einem verstärkten Kalzium-Einstrom resultiert.

Frühere Experimente meiner Forschungsgruppe mit dem am häufigsten verwendeten Tiermodell der Multiplen Sklerose, nämlich mit der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, zeigten, dass transgene Mäuse ohne die Pore-formende $\alpha_{1.2.2}$ -Untereinheit (die α_1 -Untereinheit der früher genannten N-typ-Kanälen) eine geringere Neurodegeneration und einen weniger schweren klinischen Verlauf im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Folgend wurden die gleichen Experimente an β_3 -Untereinheit-defizienten Mäusen durchgeführt. Ähnliche Ergebnisse waren damit erwartet, da die β_3 -Untereinheit vorzugsweise mit der Pore-formenden $\alpha_{1.2.2}$ -Untereinheit interagiert und es schon gezeigt worden war, dass ihre Ablation zur einer verminderten Expression dieses letzten ionleitenden Proteins auf der Zellmembran führte. Dennoch widersprachen die Ergebnisse den Erwartungen und die β_3 -defizienten Mäusen wiesen verstärkte Neurodegeneration und einen schlechteren klinischen Verlauf auf. Diese erstaunlichen Befunde zusammen mit der neueren Beschreibung mehrerer neuen Funktionen der β -Untereinheiten, warfen die Frage auf, ob das β_3 -Protein eine essenzielle Funktion im neuronalen Überleben unabhängig von seiner bekannten Rolle als akzessorische Untereinheit der Kalzium-Kanäle ausüben könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird die Überlebensfähigkeit von kultivierten β_3 -defizienten kortikalen und hippocampalen Neuronen unter *in vitro* Standardbedingungen und unter toxischer Glutamat-Konzentrationen untersucht angesichts der zentralen Rolle dieses Neurotransmitters in der Pathogenese der Multiplen Sklerose und deren Tiermodell. Dies wurde mithilfe der Auswertung immunzytochemisch gefärbter Präparate und der Verwendung von LDH-Zytotoxizitätstests evaluiert. Da die β_3 -Knock-out-Neuronen nicht intrinsisch

beeinträchtigt waren, sondern sogar eine verbesserte Überlebensfähigkeit unter excitotoxischen Bedingungen zeigten, wurde ihre intrazelluläre Kalziumsignalisierung mittels Fura-2-Kalziumbildgebung zum Verständnis dieses Phänomens untersucht. Ein reduzierter Kalziumeinstrom nach KCl-getriggerten Depolarisation wurde in den mutierten Neuronen beobachtet, was auf einen verminderten Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle hinwies. Mithilfe der Verwendung verschiedener Kalziumkanalblocker konnte ein reduzierter Kalziumeinstrom durch N-Typ- und non-L-Typ-Kalziumkanäle abgegrenzt werden. Auch konnte ein verminderter Gesamtkalzium-Einstrom in den Neuronen des Mutantenstammes nachgewiesen werden, nämlich in den kortikalen und hippocampalen Neuronen nach Stimulation mit jeweils Glutamat und NMDA und in den hippocampalen Neuronen nach Stimulation mit AMPA. Zur weiteren Untersuchung dieser Unterschiede wurden die N- und L-typ-Kalziumkanäle nach Stimulation mit vorhergenannten Agonisten sukzessiverweise blockiert. Die Zugabe der Blocker reduzierte den Kalzium-Einstrom nur in einer Subpopulation von auf AMPA reagierenden Neuronen. Außerdem ermöglichte die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede von einer verschiedenen Expression spezifischer Proteine in den zwei Stämmen bedingt waren.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Beeinträchtigung der neuronalen Überlebensfähigkeit in den β_3 -defizienten Neuronen nicht stattzufinden scheint. Deswegen sollten die Gründe, die der verstärkteren Neurodegeneration der β_3 -Knock-out experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis unterliegen, in anderen Zelltypen gesucht werden, die das β_3 -Protein exprimieren und an der Pathogenese dieser Entität teilnehmen wie unter anderem Gliazellen, Zellen der Blut-Hirn-Schranke und Immunzellen. Andererseits ist die verstärkte Resistenz der mutierten Neuronen gegen Glutamat wahrscheinlich dem nachgewiesenen reduzierten Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle zu attribuieren, da diese Kanäle nach Aktivierung der NMDA und AMPA-Rezeptoren sekundär aktiviert werden können. Deshalb befände sich dieser neuroprotektive Effekt im Einklang mit der bekannten Funktionen der β_3 -Untereinheit. Diese Ergebnisse erweitern das Wissen über die Rolle der spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle und deren spezifische Untereinheiten und ebnen den Weg für die künftige Entwicklung effektiver neuroprotektiver Strategien.