

Aus dem Institut für Funktionelle Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkungen der Calcineurin-Inhibition auf die posttranslationale
Modifikation der Kationen-Chlorid-Kotransporter im Neocortex

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Zessin

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zessin M, Strauß U, Deisz RA, Rodan AR, Pleinis JM, Borschewski A, Giesecke T, Loyola S, Schindler M, Endlich N, Mrowka R, Maillet M, McCormick JA, Mutig K, (2019).

Calcineurin Inhibition Impairs the Function of Neuronal Potassium-Chloride Cotransporter 2. FASEB J.33, No. 1_supplement: 824.14. Experimental Biology 2019, Orlando (FL).

Online verfügbar unter:

https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.824.14

[Abgerufen am 31.03.2020].

Zessin M, Boldt C, Deisz RA, Blankenstein K, Bachmann S, Mutig K, (2015).

Calcineurin Inhibitor Cyclosporine Inhibits the Neuronal K-Cl Co-transporter KCC2.

FASEB J.29, No. 1_supplement: 845.18. Experimental Biology 2015, Boston (MA)

Online verfügbar unter:

https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.29.1_supplement.845.18

[Abgerufen am 31.03.2020].

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abstrakt	X
Abstract	XII
1 Einleitung	1
1.1 Neurotoxizität nach Organtransplantation – ein relevantes Phänomen	1
1.2 Calcineurin	2
1.2.1 Struktur und Funktion von Calcineurin A β	2
1.2.2 Pharmakologische Wirkung und Nebenwirkung von Cyclosporin A.....	4
1.3 Neuronale Kationen-Chlorid-Kotransporter	5
1.3.1 Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2	6
1.3.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 1.....	8
1.4 Der WNK-SPAK/OSR1-CCC-Signalweg	10
1.4.1 WNK-Kinasen.....	10
1.4.2 Die Kinasen SPAK und OSR1	11
1.5 Die posttranslationale Regulation von KCC2 und NKCC1	12
1.6 Der WNK-SPAK-CCC-Signalweg in <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.7 Ziel der Arbeit	15
2 Methodik	17
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten	17
2.1.1 Wistar-Ratten und Cyclosporinbehandlung	17
2.1.2 Calcineurin A β ^{-/-} und SPAK ^{-/-} Mäuse.....	18
2.2 Organentnahme und Gewebepräparation.....	18
2.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung für Immunhistochemie	18

2.2.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten	19
2.2.2 Organentnahme für biochemische Versuche.....	19
2.2.2.1 Gewebeaufbereitung zur Genexpressionsanalyse	19
2.2.2.2 Gewebeaufbereitung für Western Blot und Immunpräzipitation.....	19
2.2.3 Anästhesie und Präparationstechnik zur Herstellung kortikaler Hirnschnitte	19
2.3 Elektrophysiologische Methoden.....	20
2.3.1 Intrazelluläre Ableitungen mittels scharfer Mikroelektroden	20
2.3.1.1 Bestimmung der Chlorid-Extrusions-Zeitkonstante.....	20
2.4 2-Photonen-Fluoreszenzlebenszeit-Messungen mit MQAE	21
2.4.1.1 Aufbau des 2-Photonen-FLIM Setups.....	21
2.4.1.2 Kalibrierung mit Nigericin und Tributylzinnchlorid.....	21
2.4.1.3 Messung der MQAE-Fluoreszenzlebenszeit unter CsA-Einwaschung.....	22
2.4.1.4 Analyse mit SPCImage	22
2.5 Proteinanalytische Methoden	23
2.5.1 Immunhistochemie	23
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	23
2.5.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch BCA-Test	23
2.5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
2.5.2.3 Western Blot und Blockierung unspezifischer Antigene	24
2.5.2.4 Antikörper-Inkubation.....	24
2.5.2.5 Luminolreaktion und Chemilumineszenzdetektion	25
2.5.3 Immunpräzipitation	25
2.6 Genexpressionsanalyse.....	26
2.6.1 RNA-Isolation aus Rattenhirngewebe.....	26
2.6.2 cDNA-Synthese.....	26
2.6.3 Quantitative <i>Real-Time</i> PCR mit EvaGreen®	26
2.7 Material	29

2.7.1 Antikörper	29
2.7.2 Enzyme und zugehörige Agenzien.....	30
2.7.3 Kits	30
2.7.4 Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.7.5 Verbrauchsmaterial	33
2.7.6 Geräte	34
2.7.7 Software	35
2.8 Statistik.....	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Cyclosporin A – Modulator der neuronalen Erregbarkeit.....	37
3.1.1 CsA vermindert die neuronale Chloridausschleusung	37
3.1.2 CsA akkumuliert Cl ⁻ in kortikalen Pyramidenzellen.....	38
3.2 WNK2 als Interaktionspartner von CnA β , SPAK, KCC2 und NKCC1	39
3.2.1 WNK2 enthält evolutionär konservierte Calcineurin-Bindungsmotive.....	40
3.2.2 Konfokalmikroskopische Lokalisation von KCC2, NKCC1, CnA β und pSPAK	41
3.2.3 WNK2, KCC2 und NKCC1 bilden multiple Protein-Protein-Interaktionen mit CnA β und SPAK aus	43
3.3 Akute Effekte der CsA-Behandlung <i>in vivo</i>	44
3.3.1 CsA-Kurzzeitbehandlung erhöht SPAK/OSR1- und KCC2-Phosphorylierung	44
3.3.2 CsA-Kurzzeitbehandlung erhöht KCC2-Tyrosinphosphorylierung.....	45
3.4 Chronische Effekte der CsA-Behandlung <i>in vivo</i>	47
3.4.1 CsA-Langzeitbehandlung stimuliert die SPAK-Expression	47
3.4.2 CsA-Langzeitbehandlung inhibiert KCC2 und aktiviert NKCC1.....	48
3.5 Rekapitulation der Maximaleffekte der Calcineurin- und SPAK-Inhibition mithilfe von globalen Knockout-Modellen.....	51
3.5.1 CnA β -Knockout reproduziert Effekte der chronischen CsA-Behandlung.....	51
3.5.2 SPAK-Knockout aktiviert KCC2 und hemmt NKCC1	53

4 Diskussion	56
4.1 Modulation der neuronalen Erregbarkeit durch Calcineurin-Inhibition	56
4.2 WNK2- <i>Scaffold</i> -vermittelte Interaktion von CCCs, CnA β und SPAK	57
4.3 Effekte der Calcineurin-Inhibition auf den WNK-SPAK/OSR1-CCC-Signalweg.....	59
4.3.1 Kurzzeitige CsA-Applikation.....	60
4.3.2 Chronische CsA-Applikation und CnA β -Knockout	61
4.4 Modulation der CsA-Neurotoxizität durch SPAK-Inhibition	65
4.5 Methodische Limitationen.....	67
4.6 Zusammenfassung und Ausblick	69
Literaturverzeichnis.....	71
Eidesstattliche Versicherung	81
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen.....	82
Lebenslauf.....	83
Publikationsliste	84
Danksagung.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Aktivierung von CnA β	3
Abbildung 2: Pharmakologische Wirkung der Calcineurin-Inhibition	5
Abbildung 3: Struktur des KCC2-Transporters	7
Abbildung 4: Neuronale Erregbarkeit in Abhängigkeit von $[Cl^-]_i$ und CCC-Funktion	12
Abbildung 5: Bestimmung der Chloridausschleusungszeitkonstante mit scharfen Mikroelektroden	38
Abbildung 6: 2P-FLIM in MQAE-beladenen Pyramidenzellen	39
Abbildung 7: Überprüfung der WNK2-Aminosäuresequenz auf Calcineurin- Bindungsmotive.....	40
Abbildung 8: Lokalisation von KCC2 und NKCC1 im Cortex und Plexus choroideus	41
Abbildung 9: Kolokalisation von CnA β , KCC2, NKCC1 und pSPAK.....	42
Abbildung 10: Co-Immunpräzipitation von WNK2, KCC2, und NKCC1	43
Abbildung 11: Schema der abgeleiteten Interaktionen von WNK2, CnA β , SPAK und KCC2a/b.....	44
Abbildung 12: Effekte der CsA-Kurzzeitbehandlung auf die Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und SPAK/OSR1	45
Abbildung 13: Effekte der CsA-Kurzzeitbehandlung auf die KCC2- Tyrosinphosphorylierung	46
Abbildung 14: Effekte der CsA-Langzeitbehandlung auf die mRNA-Expression von WNK2, SPAK/OSR1, Gesamt-KCC2, KCC2a/b und NKCC1	48
Abbildung 15: Effekte der CsA-Langzeitbehandlung auf die Abundanz und Phosphorylierung von WNK2, SPAK/OSR1, KCC2 und NKCC1.....	49
Abbildung 16: Fluoreszenzintensität von pS940-KCC2 in Schicht V Cortexneuronen der Wistar-Ratte nach 14-tägiger Vehikel- oder CsA-Behandlung.....	50
Abbildung 17: Verifikation des CnA β -Knockouts mittels Western Blot	51

Abbildung 18: Effekte des CnA β -Knockouts auf Abundanz und Phosphorylierung von KCC2, NKCC1 und SPAK/OSR1.....	52
Abbildung 19: Verifikation des SPAK-Knockouts mittels Western Blot.....	53
Abbildung 20: Effekte des SPAK-Knockouts auf Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und NKCC1.....	55
Abbildung 21: Schema abgeleiteter funktioneller Interaktionen von Calcineurin bei der Regulation von KCC2 und NKCC1 in kortikalen Neuronen.....	64
Abbildung 22: Bang sensitivity-Assay in <i>Drosophila melanogaster</i>	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: qPCR-Profil.....	27
Tabelle 2: Verwendete qPCR Primer.....	28
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für Western Blot und Immunhistochemie	29
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper.....	30
Tabelle 5: Enzyme und zugehörige Agenzien.....	30
Tabelle 6: Verwendete Kits.....	30
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	31
Tabelle 8: Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 9: Liste der Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 10: Verwendete Geräte.....	34
Tabelle 11: Verwendete Software	35

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Calciumkonzentration
[Cl ⁻]	Chloridkonzentration
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ACSF	Künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCC	Kationen-Chlorid-Kotransporter
cDNA	Komplementäre DNA
CnA/B	Calcineurin A/B
CnA β	Calcineurin A β -Untereinheit
CNQX	Cyanquixalin
CsA	Cyclosporin A
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CyPA/D	Cyclophilin A/D
D	Asparaginsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
D-APV	D-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Glutaminsäure
<i>E</i>	Umkehrpotenzial
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FK506	Tacrolimus
FKBP12	FK506 bindendes Protein 12
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
IQR	Interquartilsabstand
<i>kcc</i>	<i>kazachoc</i>
KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter Typ 2

KG	Körpergewicht
MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
MQAE	<i>1-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide</i>
NA	Numerische Apertur
NCC	Na ⁺ -Cl ⁻ Kotransporter
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NKCC1/2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter Typ 1/2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OSR1	<i>Oxidative stress-response kinase 1</i>
p	Phospho-
P	Postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PP	Proteinphosphatase
PP2B	Calcineurin
PRES	Posteriores reversibles Enzephalopathiesyndrom
PSP	Postsynaptisches Potenzial
qPCR	Quantitative <i>Real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SLC12	<i>Solute carrier 12</i>
SPAK	<i>Ste20- and SPS1-related proline and alanine rich kinase</i>
Src-Kinase	<i>Sarcoma</i> -Kinase
T	Threonin
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBT	Tributylzinnchlorid
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
V _m	Membranpotenzial
Veh	Vehikel
WNK	<i>With-no-lysine (K)-kinase</i>
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

Abstrakt

Hintergrund: Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CsA) sind klinisch relevante und effektive Immunsuppressiva, aber neurologische Nebenwirkungen, beispielsweise zerebrale Krampfanfälle, limitieren ihr therapeutisches Potenzial. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind nicht hinreichend charakterisiert. Für die Regulation neuronaler Erregbarkeit ist die intrazelluläre Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$) von entscheidender Bedeutung, da sie die Stärke und Polarität der GABAergen Transmission determiniert. Sekundär aktive Kationen-Chlorid-Kotransporter wie der K^+ - Cl^- Kotransporter 2 (KCC2) und der Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ Kotransporter 1 (NKCC1) bestimmen die $[Cl^-]_i$. Phosphorylierung durch *with-no-lysine* Kinasen (WNKs) und die *STE20/SPS1-related kinase* (SPAK) inhibiert den Cl^- -Exporter KCC2, aber aktiviert den Cl^- -Importer NKCC1. In der Niere wird die WNK-SPAK-Kaskade durch Calcineurin supprimiert. Diese Arbeit verfolgt die Hypothese, dass Calcineurin ebenfalls als endogener Regulator des WNK-SPAK-Signalweges im zentralen Nervensystem fungiert und pharmakologische Calcineurin-Inhibition in neuronaler Cl^- -Akkumulation und Übererregbarkeit resultiert.

Methoden: CsA-abhängige Effekte auf die neuronale Cl^- -Homöostase wurden *ex vivo* in kortikalen Hirnschnitten der Wistar-Ratte mittels intrazellulärer Ableitungen und Messungen der 2-Photonen-Fluoreszenz-Lebenszeit des Cl^- -Sensors MQAE untersucht. Durch Immunpräzipitation wurden physische Interaktionen zwischen WNK2, SPAK, Calcineurin und KCC2 bzw. NKCC1 evaluiert. Effekte akuter und chronischer CsA-Applikation auf Expression, Abundanz und Phosphorylierung dieser Produkte wurden im Gehirn der Wistar-Ratte durch Immunhistochemie, qPCR und Western Blot charakterisiert. Korrelativ wurden Western Blots aus Calcineurin A β (CnA β)- sowie SPAK-defizientem Hirngewebe der Maus angefertigt.

Ergebnisse: Die Applikation von CsA (10 μ M, 1 h) führte zu einer verlängerten Cl^- -Extrusionszeit und gesteigerten $[Cl^-]_i$ in kortikalen Pyramidenzellen. Zwischen Calcineurin, WNK2, SPAK und KCC2/NKCC1 konnten multiple Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden, die die Ausbildung eines multimolekularen Komplexes um WNK2 als *Scaffold* suggerierten. Die intraperitoneale CsA-Gabe (25 mg/kg KG, 1 h oder 14 d) führte kurzfristig zur Steigerung der aktivierenden S383-SPAK- Phosphorylierung sowie der inhibitorischen, SPAK-abhängigen T1007-KCC2-Phosphorylierung. Auch die inhibitorische KCC2-Tyrosinphosphorylierung war erhöht. Durch chronische CsA-Applikation steigerten sich S383-SPAK- und T1007-KCC2-Phosphorylierung ebenfalls. Zusätzlich zeigte sich eine Reduktion der aktivierenden S940-KCC2-

Phosphorylierung und Steigerung der NKCC1-Abundanz. In CnA β -defizienten Mäusen konnten diese Ergebnisse reproduziert werden, während sich in SPAK-defizienten Mäusen reziproke Veränderungen zeigten.

Schlussfolgerung: Diese Arbeit etabliert die Phosphatase Calcineurin als endogenen Regulator der SPAK-Aktivität im zentralen Nervensystem von Nagetieren. Die pharmakologische Calcineurin-Inhibition mit CsA aktiviert den WNK-SPAK-Signalpfad. Dies resultiert in vermehrter hemmender KCC2- und aktivierender NKCC1-Phosphorylierung, was wiederum zu intrazellulärer Cl⁻-Akkumulation und neuronaler Übererregbarkeit führt. Aus diesem neuen Mechanismus der KCC2-Regulation durch Calcineurin ergeben sich translationale Perspektiven für die Behandlung der CsA-vermittelten Neurotoxizität und epileptischer Erkrankungen mit SPAK-Inhibitoren.

Abstract

Background: Calcineurin Inhibitors, like cyclosporine A (CsA), are clinically relevant and efficacious immunosuppressive agents, but neurologic side effects, such as seizures, limit their therapeutic potential. Their underlying pathomechanisms are characterized insufficiently. The intracellular chloride concentration $[Cl^-]_i$ is crucial for the regulation of neuronal excitability because it determines strength and polarity of GABAergic transmission. Secondary active cation-coupled chloride cotransporters like the K^+-Cl^- co-transporter 2 (KCC2) and the $Na^+-K^+-2Cl^-$ co-transporter 1 (NKCC1) adjust $[Cl^-]_i$. Phosphorylation by with-no-lysine kinases (WNKs) and the STE20/SPS1-related kinase (SPAK) inhibits the chloride exporter KCC2, but activates the chloride importer NKCC1. In the kidney, calcineurin suppresses the WNK-SPAK cascade. This thesis tests the hypothesis that calcineurin similarly acts as an endogenous regulator of WNK-SPAK signaling in the central nervous system. Pharmacologic calcineurin inhibition thus should result in neuronal chloride accumulation and hyperexcitability.

Methods: CsA-induced effects on neuronal chloride homeostasis were investigated ex vivo in cortical Wistar rat brain slices, deploying intracellular recordings and Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging with the chloride sensor MQAE. Using co-immunoprecipitation, physical interactions between WNK2, SPAK, calcineurin and KCC2 or NKCC1 were characterized. Effects of acute and chronic application of CsA on expression, abundance and phosphorylation of these products were evaluated by immunohistochemistry, RT-PCR and western blot. For correlation, western blots were performed in calcineurin A β (CnA β)- and SPAK-deficient mouse brain.

Results: Application of CsA (10 μ M, 1 h) lead to a prolongation of chloride extrusion time and raised $[Cl^-]_i$ in cortical pyramidal neurons. Multiple interactions were detected between WNK2, SPAK, calcineurin, and KCC2 or NKCC1, suggesting the formation of a multimolecular complex around WNK2 as scaffold. Intraperitoneal application of CsA (25 mg/kg, 1 h or 14 d) raised the activating S383-SPAK phosphorylation and the inhibitory, SPAK-dependent T1007-KCC2 phosphorylation. Additionally, the inhibitory KCC2 tyrosine phosphorylation was elevated short term whereas a reduction of the activating S940-KCC2 phosphorylation and increased NKCC1 abundance were present in the long term. These results were reproduced in CnA β -deficient mice while SPAK-deficient mice showed reciprocal changes.

Conclusion: This study establishes the phosphatase calcineurin as endogenous regulator of SPAK activity in the rodent central nervous system. Pharmacologic inhibition of calcineurin by CsA activates the WNK-SPAK-signaling pathway. This results in increased inhibitory KCC2

phosphorylation and activating NKCC1 phosphorylation, thus leading to intracellular chloride accumulation and neuronal hyperexcitability. Translational perspectives for therapeutic management of CsA-induced neurotoxicity and epileptic disorders can be derived from this mechanism in the form of pharmacological SPAK inhibition.

1 Einleitung

1.1 Neurotoxizität nach Organtransplantation – ein relevantes Phänomen

Die Calcineurin-Inhibitoren (CNI) Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus sind nach Organ- oder hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) eingesetzte Immunsuppressiva, welche die immunologische Reaktion des Empfängers auf das Transplantat modulieren und so eine zelluläre Abstoßung verhindern (1-3). CsA wurde erstmalig 1978 im Rahmen einer renalen Allotransplantation angewendet und wird noch 2019 in der Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der *World Health Organization* aufgeführt (4, 5).

Trotz ihrer essentiellen pharmakologischen Wirkung ist die Calcineurin-Inhibition mit zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) assoziiert (6, 7). Klinisch bedeutsam sind neben der ausgeprägten Nephrotoxizität auch neurologische UAW, welche sich unter anderem in Form von neuropathischen Schmerzen, Tremor oder Krampfanfällen manifestieren können (7, 8). Die Inzidenz neurologischer Komplikationen nach Organtransplantation oder HSCT wird abhängig vom transplantierten Gewebe mit 10-30 % angegeben (9, 10). Neu aufgetretene Krampfanfälle werden in 5-10 % der Patienten beschrieben und sind häufig auf akute toxische Effekte der Calcineurin-Inhibition zurückzuführen (7, 11, 12). So identifizierten beispielsweise Navarro *et al.* in einer Beobachtungsstudie mit 166 Patienten nach Herztransplantation die Immunsuppression mit CsA als Ursache für die Hälfte der neu aufgetretenen Krampfanfälle im Beobachtungszeitraum (12).

Als zugrundeliegender Pathomechanismus der CNI-Neurotoxizität wird die Dysregulation der Blut-Hirn-Schranke durch arterielle Hypertonie und Verlust der zerebralen Autoregulation mit konsekutivem vasogenem Hirnödem postuliert, wodurch sich die Exposition des zentralen Nervensystems (ZNS) gegenüber CNI erhöht (13, 14). Das Stromgebiet der *Arteria cerebri posterior* im Bereich des dorsalen Telencephalons stellt hierbei den häufigsten Manifestationsort dar, weswegen der resultierende neurologische Symptomkomplex als posteriores, reversibles Enzephalopathiesyndrom (PRES) bezeichnet wird (13, 15). Während im Rahmen des PRES Prodrome in Form von Kopfschmerzen, Tremor und Parästhesien auftreten können, sind Krampfanfälle, Sehstörungen und quantitative Bewusstseinsstörungen oftmals die ersten klinischen Symptome, welche häufig eine Dosisreduktion der immunsuppressiven Therapie oder den Wechsel auf ein anderes Präparat erfordern (13). In verschiedenen Studien wird die Inzidenz des PRES von 0,5 % nach Organtransplantation bis zu 7 % nach HSCT beschrieben (16-18). Ungeachtet der langen klinischen Erfahrung mit CNI und der Häufigkeit neurologischer

Komplikationen unter CNI-Therapie sind die molekularen Pathomechanismen ihrer ZNS-Toxizität nur unzureichend charakterisiert. Eine spezifische Therapie benötigt daher neue Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung.

1.2 Calcineurin

Die immunsupprimierende Wirkung von CsA und Tacrolimus wird über die Hemmung der Calcineurin-Phosphatase in T-Lymphozyten vermittelt, während UAW oftmals auf Effekte der Calcineurin-Inhibition in anderen Zelltypen zurückzuführen sind (19-22). Calcineurin ist eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase aus der Gruppe der Serin-/Threoninphosphatasen, zu denen auch die Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A und 2C zählen (23, 24). Strukturell lässt sich Calcineurin als ein Heterodimer (s. Abbildung 1), bestehend aus einer katalytischen Domäne (Calcineurin A, CnA) und einer regulatorischen Domäne (Calcineurin B, CnB), beschreiben (25). CnA und CnB werden durch mehrere Gene kodiert, aus denen die Isoformen CnA α (PPP3CA), CnA β (PPP3CB), CnA γ (PPP3CC), CNB1 (PPP3R1) und CNB2 (PPP3R2) hervorgehen.

Im ZNS von Säugetieren werden CnA α und CnA β reichlich in einer Vielzahl von Regionen exprimiert (24, 26, 27). Kortikal sind diese katalytischen Calcineurin-Isoformen vor allem, aber nicht ausschließlich, in Schicht III und VI Neuronen angereichert, während CnA β zusätzlich verstärkt in Schicht V Pyramidenzellen vorkommt (26). Letztere bilden in ihrer Funktion als erstes Motoneuron des *Tractus corticospinalis* eine entscheidende Schnittstelle für die Übertragung neuronaler Impulse auf die Skelettmuskulatur. Neben dem Cortex werden beide Isoformen auch hippocampal und zerebellär beinahe ubiquitär exprimiert (26). Lediglich in den Purkinje-Zellen des Cerebellums ist kein CnA α detektierbar (26). In dieser Arbeit wird CnA β im Fokus der Betrachtung stehen, da vorausgegangene Studien (21, 22, 28) die Bedeutsamkeit dieser Isoform für die Entwicklung CNI-induzierter UAW zeigen konnten (s. 1.2.2).

1.2.1 Struktur und Funktion von Calcineurin A β

CnA β besteht aus 521 Aminosäuren (AS) und unterscheidet sich von den anderen CnA-Isoformen durch seinen Prolin-reichen N-Terminus (29, 30). An diesen schließt sich die katalytische Domäne (346 AS) mit je einem Zn²⁺ und Fe³⁺ Ion im aktiven Zentrum an. Es folgen eine CnB- und eine Calmodulin-bindende Domäne (26 AS bzw. 24 AS) sowie die C-terminale autoinhibitorische Domäne (17 AS), die das aktive Zentrum von CnA β sterisch blockiert (29). Im inaktiven Zustand wird CnA β zusätzlich durch Heterodimerisierung mit der regulatorischen CnB-Einheit inhibiert (s. Abbildung 1) (31).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert den *Second Messenger* Calmodulin und führt über Modulation der stereologischen Konformation CnA β -Calmodulin-Komplexes zur Disinhibition von CnA β (24). Zudem besitzt die inhibierende CnB-Untereinheit zwei EF-Handmotive, die nach Bindung an Ca^{2+} eine CnB-Konformationsänderung induzieren (31). Insgesamt resultiert dies in einer Veränderung der Calcineurin-Tertiärstruktur, wodurch das aktive Zentrum freigelegt und die Phosphatase endgültig aktiviert wird (32).

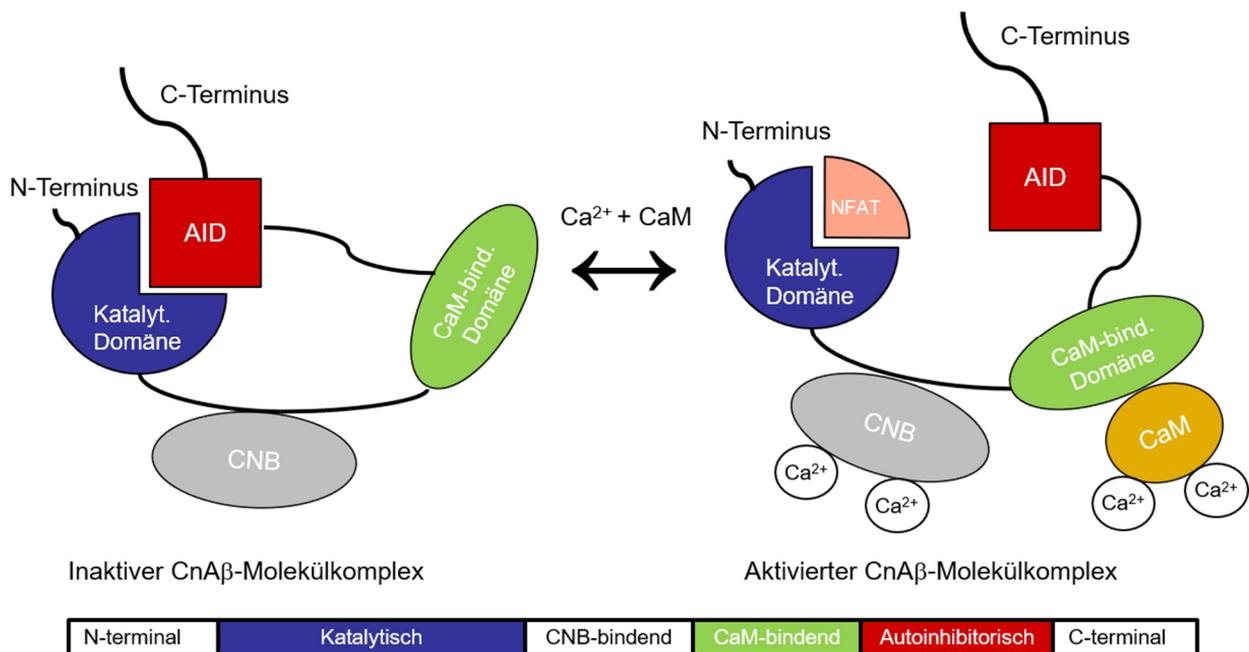


Abbildung 1: Struktur und Aktivierung von CnA β

Schematische Darstellung des CnA β -Molekülkomplexes im inaktiven Zustand (links) und im aktivierten Zustand (rechts). CnA β bildet ein Heterodimer mit dem inhibierenden Calcineurin B (CNB) aus. Im inaktiven Zustand wird die katalytische Domäne zusätzlich durch die autoinhibitorische Domäne (AID) blockiert. Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Konformationsänderung von CnA β durch Aktivierung von Calmodulin (CaM) sowie Bindung von Ca^{2+} an CNB und resultiert in der Freilegung des aktiven Zentrums. Calcineurin-Substrate wie NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) können jetzt katalytisch dephosphoryliert werden. Unten: Schematische Darstellung der CnA β -Sequenz. Angelehnt an Rumi-Masante et al. (33).

Die Funktion von Calcineurin besteht in der Dephosphorylierung von phosphorylierten Serinen oder Threoninen durch enzymatische Abspaltung des gebundenen Phosphatrests. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen reguliert eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in unterschiedlichen Zellen und Geweben, beispielsweise die Aktivierung von T-Lymphozyten (34), die Salzresorption in der Niere (28), die Entstehung von Herzhypertrophie (35) sowie die Regulation neuronaler Erregbarkeit (36). Die Substratspezifität von Calcineurin wird durch verschiedene Bindungsmotive in der

Aminosäuresequenz von Zielproteinen der Phosphatase gewährleistet. Entsprechend der IUPAC-Nomenklatur der Aminosäuren (AS) benannt, ist PxIxIT (x = beliebige AS) als primäres und LxVP als sekundäres Calcineurin-Bindungsmotiv identifiziert worden, wobei die pharmakologische Wirkung von CNI auf Blockade der Interaktion mit LxVP-Motiven basiert (37).

1.2.2 Pharmakologische Wirkung und Nebenwirkung von Cyclosporin A

Das zyklische Undekapeptid CsA ist ein spezifischer Inhibitor von Calcineurin (19). Nach Bindung an das Immunophilin Cyclophilin A (CyPA) besetzt der CsA-CyPA-Komplex die LxVP-bindende Furche der Calcineurin-Phosphatase, wodurch die Interaktion mit ihren Substraten kompetitiv gehemmt wird (19, 37). In T-Lymphozyten führt dies zu einer verminderten Calcineurin-abhängigen Dephosphorylierung des *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) (38). NFAT ist ein zytosolischer Transkriptionsfaktor, der nach Dephosphorylierung in den Zellkern migriert und die Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-2, IL-6 und TNF- α initiiert, was in der Aktivierung der T-Zelle resultiert (38, 39). Dieser Prozess ist maßgeblich für akute zelluläre Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation verantwortlich und wird durch CNI unterbunden (s. Abbildung 2) (39). UAW von CsA werden hingegen häufig durch die verringerte Calcineurin-Aktivität in anderen Zellen als T-Lymphozyten verursacht. In der Niere führt die Calcineurin-Inhibition zu einer strukturellen und funktionellen renalen Schädigung mit Hyperkaliämie und arterieller Hypertonie (21, 22, 40). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen beinhalten die übermäßige Aktivierung renaler Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCC). Der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter Typ 2 (NKCC2) sowie der Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC) sind sekundär aktive Vertreter der CCC-Familie, die in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und dem distalen Konvolut Salzionen aus dem Primärharn rückresorbieren und so die Wasser- und Elektrolythomöostase regulieren (41). Phosphorylierung dieser Transporter durch die Kinasen SPAK (*STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase*) und OSR1 (*oxidative stress response kinase 1*) steigert deren Transportaktivität (42). Calcineurin ist in die Dephosphorylierung und Inaktivierung von NKCC2 und NCC kritisch involviert, sodass CNI zu deren gesteigerter Phosphorylierung sowie Funktion führen und eine renale Salz- und Wasserretention verursachen (21, 22, 28). Auch im ZNS werden Calcineurin, CCC-Isoformen und SPAK/OSR1 exprimiert, wo ihr Zusammenspiel in erster Linie die GABA- (γ -Aminobuttersäure) und Glycin-vermittelte synaptische Transmission moduliert und so die neuronale Erregbarkeit steuert (36, 42-44). Im Folgenden wird daher auf Struktur, Funktion und Regulation der beiden wichtigsten Vertreter neuronaler CCCs eingegangen.

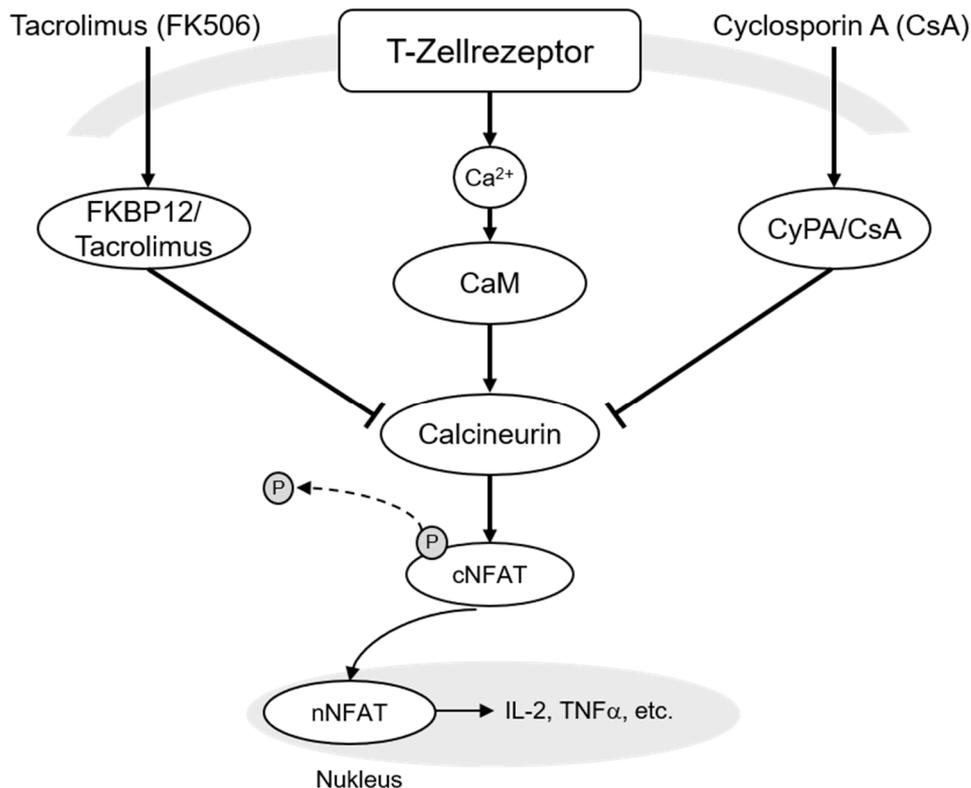


Abbildung 2: Pharmakologische Wirkung der Calcineurin-Inhibition

Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) in T-Lymphozyten. Die Calcium-/Calmodulin (CaM)-vermittelte Aktivierung von Calcineurin dephosphoryliert den zytosolischen *nuclear factor of activated T cells* (cNFAT) und induziert seine Translokation in den Nukleus. Dort initiiert er die Transkription von Genen proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-2, IL-6 und TNF α). CsA und Tacrolimus binden intrazellulär an Cyclophilin A (CyPA) oder das FK506 bindende Protein 12 (FKBP12). Der jeweilige Komplex inhibiert Calcineurin und verhindert die T-Zellaktivierung. Angelehnt an Williams und Gooch (39).

1.3 Neuronale Kationen-Chlorid-Kotransporter

Sekundär aktive CCCs der *solute carrier 12* (SLC12) Familie vermitteln den Transport von Cl⁻ und Kationen über die neuronale Plasmamembran. Die Energie für diesen Transport wird durch die Na⁺-K⁺-ATPase bereitgestellt, welche transmembranäre Na⁺- und K⁺-Gradienten in Abhängigkeit von Adenosintriphosphat (ATP) generiert. Unter physiologischen Bedingungen sind Na⁺-abhängige sekundäre Transportprozesse einwärtsgerichtet, während K⁺-abhängige auswärtsgerichtet sind. CCCs sind jedoch bidirektionale Transporter und können in Abhängigkeit der tatsächlich vorliegenden Ionengradienten Transport in beide Richtungen vermitteln (45, 46). Obwohl dieser Prozess elektroneutral abläuft, wird durch ihn ein osmotischer Gradient erzeugt, wodurch konsekutiv ebenfalls eine Verschiebung von Wasser nach intra- oder extrazellulär erfolgt (42). Wichtige Funktionen neuronaler CCCs beinhalten daher die Regulation des Zellvolumens

und der Cl⁻-Homöostase, letztere besitzt direkten Einfluss auf die zelluläre Erregbarkeit (46, 47). Die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ($[Cl^-]_i$) determiniert Polarität und Stärke der Transmission durch Typ A GABA- (GABA_A-) und Glycin-Rezeptoren, welche zur Gruppe der ligandengesteuerten Cl⁻-Kanäle gehören (47, 48). Hohe $[Cl^-]_i$ führen zu einer Verschiebung der Lage des Cl⁻-Umkehrpotenzials (E_{Cl}) und resultieren in weniger hyperpolarisierenden oder sogar depolarisierenden synaptischen Antworten auf GABA und Glycin (s. Abbildung 4) (47, 48). Diese beeinträchtigte synaptische Inhibition kann zu neuronaler Übererregbarkeit bis hin zur Entwicklung von zerebralen Krampfanfällen führen (49, 50).

1.3.1 Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2

Der durch das Gen *Slc12a5* kodierte K⁺-Cl⁻-Kotransporter Typ 2 (KCC2) ist eine von vier KCC-Isoformen (KCC1-4) in Säugetieren und wird spezifisch in Neuronen des ZNS, jedoch nicht im peripheren Nervensystem exprimiert (51). KCC2 besitzt zwölf α -Helix Transmembrandomänen sowie die intrazellulären N- und C-Termini mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen, über die seine Aktivität und Membranstabilität reguliert werden (s. Abbildung 3) (51). Eine große extrazelluläre Schleife des Transporters ist Ort extensiver Glykosylierung, wodurch die tatsächliche molekulare Masse bei ~140 kDa statt der errechneten Masse von ~125 kDa liegt (51). Physiologisch vermittelt KCC2 den K⁺-gekoppelten Cl⁻-Transport nach extrazellulär entlang eines K⁺-Gradienten.

Zwei distinkte Isoformen des Transporters (KCC2a, 1138 AS sowie KCC2b, 1115 AS), die sich lediglich durch 23 AS im N-Terminus unterscheiden, entstehen durch Transkription zweier alternativer erster Exons (52). Bedeutsam ist hierbei, dass KCC2a über ein N-terminales RFX(V/I) SPAK-Bindungsmotiv verfügt, während dieses Bindungsmotiv der prädominant in adulten Neuronen exprimierten KCC2b-Isoform fehlt (s. 1.4.2) (52-54). Im Gegensatz zu anderen KCC-Isoformen ist KCC2 unter isotonischen Bedingungen aktiv und muss nicht erst durch hypotonen osmotischen Stress aktiviert werden (55). Dies ermöglicht es dem Transporter unter physiologischen Bedingungen eine niedrige neuronale $[Cl^-]_i$ als Grundlage inhibitorischer synaptischer Transmission zu etablieren. Darüber hinaus vermittelt KCC2 den größten Anteil der neuronalen Cl⁻-Extrusion im Vergleich zu anderen Transportern und Ionenkanälen, wie z.B. spannungsgesteuerten Cl⁻-Kanälen oder Anionenaustauschern (56).

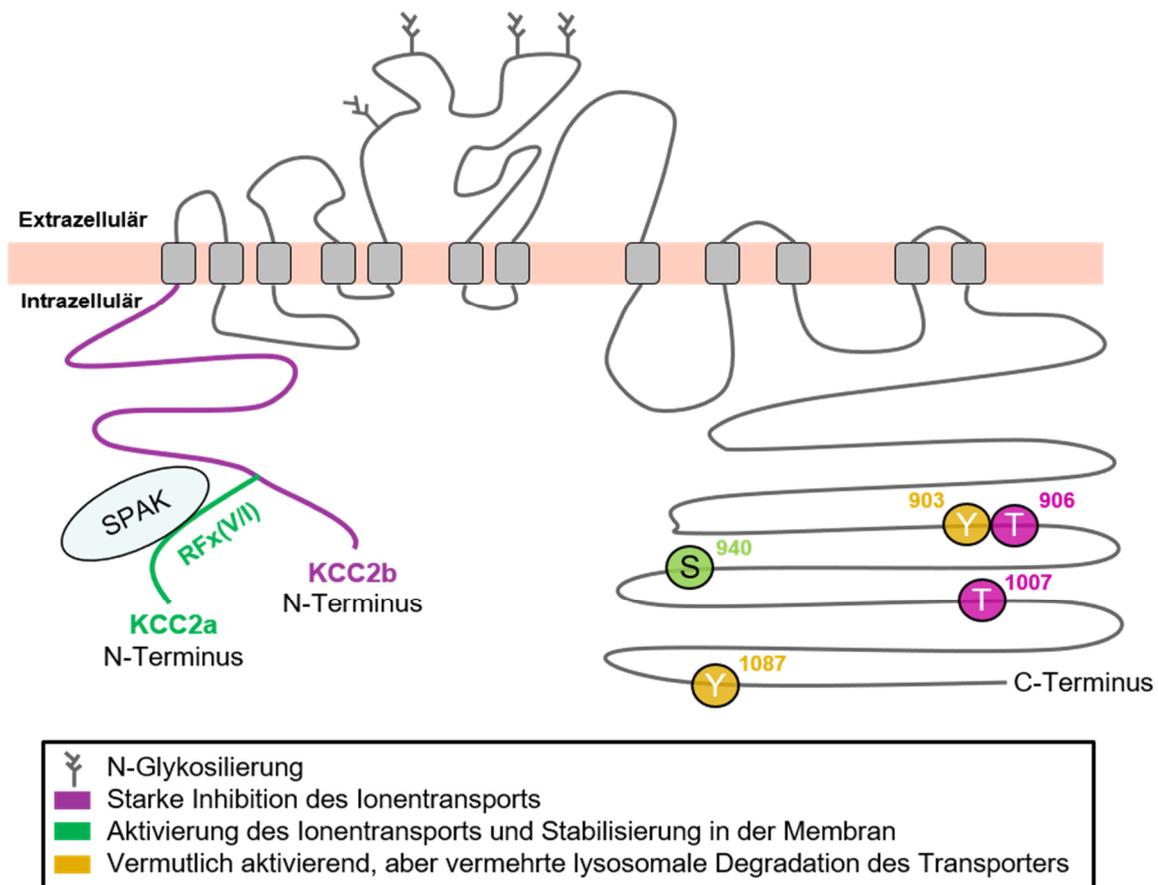


Abbildung 3: Struktur des KCC2-Transporters

Schematische Darstellung des membranständigen KCC2-Transporters. Die Isoformen KCC2a und KCC2b unterscheiden sich im ersten Abschnitt des N-Terminus. Nur KCC2a besitzt das RFx(V/I)-Bindungsmotiv, das eine direkte Interaktion mit der SPAK-Kinase ermöglicht. C-terminal angeordnete regulatorische Phosphorylierungsstellen sind funktionsabhängig farblich markiert. Angelehnt an Medina et al. (57).

Während der postnatalen Entwicklung des Gehirns wird die Expression der KCC2b-Isoform stark heraufreguliert, während ihre inhibitorische Threonin-Phosphorylierung reduziert wird (43, 58). Die damit verbundene KCC2b-Aktivierung resultiert in einem großen Anstieg der Cl⁻-Extrusionskapazität und etabliert eine niedrige [Cl⁻]_i in kortikalen Neuronen (58). Die bis zu diesem Zeitpunkt depolarisierende Wirkung von GABA und Glycin kehrt sich hierdurch in die adulte, inhibitorische Wirkung um (58). In Mäusen wird dieser Prozess bis zum postnatalen Tag (P) 15 vervollständigt (58), in Ratten benötigt er etwa zwei Tage länger (59, 60). Zur Evaluation der Effekte von CsA auf die neuronale Cl⁻-Homöostase werden in dieser Arbeit ausschließlich Tiere verwendet, die diesen Prozess der kortikalen Reifung bereits abgeschlossen haben.

Die immense Wichtigkeit eines intakten KCC2-vermittelten Transports für die Aufrechterhaltung basaler ZNS-Funktionen wird in Studien mit genetisch modifizierten Mäusen deutlich. Ein vollständiger KCC2-Knockout resultiert in nicht überlebenden Tieren, die kurz nach der Geburt an respiratorischem Versagen sterben (61). Ursache hierfür ist eine gestörte

Atemrhythmusgeneration im Prä-Bötzinger-Komplex des Hirnstamms (61). Auch ein selektiv KCC2b-defizientes Mausmodell, welches bei Geburt noch keinen Phänotyp aufweist, ist nicht überlebensfähig (62). Innerhalb weniger postnataler Tage entwickeln die Mäuse eine abnorme Körperhaltung, Gangstörungen und spontane Krampfanfälle, wodurch sie zwischen P12 und P17 versterben (62). Elektrophysiologische Messungen in kultivierten primären Neuronen der KCC2b-Knockout Maus zeigen, dass auch nach drei Wochen die neuronale $[Cl^-]_i$ nicht signifikant abfällt, was die funktionelle Notwendigkeit der KCC2b-Isoform für die Entwicklung der inhibitorischen synaptischen Transmission veranschaulicht (63). Ein weiteres genetisch verändertes Tiermodell existiert in Form von KCC2-hypomorphen Mäusen, die nur etwa 20% der regulären KCC2-Expression besitzen und nur einen milden Phänotyp aufweisen: Träger der hypomorphen Mutation sind überlebens- und fortpflanzungsfähig und besitzen eine normale lokomotorische Aktivität (64). Dennoch zeigen sie ein Wachstumsdefizit und verstärktes ängstliches Verhalten (64). Eine 20%-ige Restaktivität des Transporters erscheint also ausreichend, um zumindest die letalen Effekte des vollständigen KCC2-Funktionsverlusts zu kompensieren.

Diese Ergebnisse suggerieren, dass eine defiziente KCC2-Funktion auch im Menschen Ursache für neurologische Erkrankungen mit pathologischer synaptischer Transmission sein könnte. Tatsächlich wurden Mutationen im *Slc12a5*-Gen bei Patienten mit hereditären Fieberkrämpfen, schwerer generalisierter Epilepsie und der autosomal-rezessiven malignen migrierenden Partialepilepsie des Kindes nachgewiesen (65-67). Auch elektrophysiologische Studien an humanen epilepsie- und tumorchirurgischen Hirnresektaten zeigten eine verminderte KCC2-Funktion und depolarisierende GABAerge Transmission im Hippocampus und an den Übergängen von Tumor- zu gesundem Hirngewebe, was die Assoziation von beeinträchtigter neuronaler Cl^- -Homöostase und dem Auftreten neurologischer Störungen im Menschen verstärkt (56, 68).

Die spezieübergreifende Beteiligung von KCC2 an der Entwicklung synaptischer Übererregbarkeit sowie die Zugehörigkeit zur CCC-Familie, deren renal exprimierte Mitglieder durch Calcineurin reguliert werden, machen die KCC2-Funktion unter Calcineurin-Inhibition zu einem zentralen Betrachtungspunkt dieser Arbeit.

1.3.2 Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 1

Ein weiterer wichtiger Vertreter neuronaler CCCs ist der durch das *Slc12a2*-Gen kodierte $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Kotransporter Typ 1 (NKCC1) (69). Das humane Protein besteht aus 1212 AS und weist ein Molekulargewicht von 131,3 kDa auf (70). Wie auch KCC2 besitzt NKCC1 zwölf α -Helix Transmembrandomänen sowie intrazelluläre C- und N-Termini, wobei seine regulatorischen Phosphorylierungsstellen im Gegensatz zu KCC2 N-terminal lokalisiert sind (s. 1.5) (54, 70).

NKCC1 vermittelt unter physiologischen Bedingungen den kationengekoppelten Transport von Cl^- nach intrazellulär in Abhängigkeit eines durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aufgebauten Na^+ -Gradienten (70). Große strukturelle Ähnlichkeit besteht zum renalen NKCC2-Transporter. Sowohl NKCC1 als auch NKCC2 können durch die in der klinischen Praxis breit angewandten Diuretika Bumetanid und Furosemid inhibiert werden, jedoch unterscheiden sich beide Transporter stark in Bezug auf ihre gewebsspezifische Expression. Während NKCC2 ausschließlich in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und der Macula densa der Niere exprimiert wird und zur Na^+ -Resorption, Harnkonzentrierung sowie dem Prozess des tubuloglomerulären Feedbacks beiträgt (71, 72), findet sich NKCC1 in einer Vielzahl verschiedener extrarenaler Zelltypen. Beispielsweise wird NKCC1 in zentralen Neuronen (60), Plexus choroideus (73), glatter Gefäßmuskulatur (74), Zellen des Innenohrs (75) und den intestinalen, interstitiellen Zellen von Cajal (76) exprimiert, woraus sich zahlreiche funktionelle Implikationen für die neuronale Erregbarkeit, Liquorsekretion, Funktion des Gleichgewichtsorgans, Blutdruckregulation und Darmperistaltik ergeben. Wie NKCC2 und NCC wird NKCC1 durch SPAK/OSR1-vermittelte Phosphorylierung aktiviert, welche durch zwei N-terminal konservierte RFX(V/I)-Bindungsmotive ermöglicht wird (s. 1.5) (54). Die Sequenz eines der beiden SPAK/OSR1-Bindungsmotive überlagert sich mit einem PP1-Bindungsmotiv, was eine Konkurrenz zwischen aktivierenden Kinasen und inhibierender Phosphatase an dieser Stelle suggeriert (77).

Die Bedeutung von NKCC1 für die Cl^- -Homöostase und neuronale Erregbarkeit des ZNS wird kontrovers diskutiert. Während der postnatalen Entwicklung des Gehirns wird die NKCC1-Expression in kortikalen Neuronen stark herabreguliert, wodurch der sekundär aktive Cl^- -Import reduziert wird (60, 78). Für die tatsächliche Etablierung einer niedrigen $[\text{Cl}^-]_i$ und effektiven inhibitorischen Transmission ist vermutlich jedoch der gesteigerte, KCC2-vermittelte Cl^- -Export bedeutsamer, wofür die Erkenntnisse aus KCC2b-Knockout-Studien sprechen (s. 1.3.1) (63). Des Weiteren konnten in verschiedenen Subtypen von Neuronen nach Inkubation mit dem NKCC1-Inhibitor Bumetanid nur minimale Veränderungen des E_{Cl} im Vergleich zu Wildtyp- (WT) Neuronen nachgewiesen werden, was einen generell niedrigen NKCC1-vermittelten Transport suggeriert (60, 79).

Die phänotypische Charakterisierung eines NKCC1-defizienten Mausmodells unterstreicht zusätzlich die primäre Relevanz des Transporters in peripheren Nerven und extraneuronalen Zellen (75, 80). NKCC1-Depletion führt in diesen Mäusen zu sensorineuraler Taubheit und Gleichgewichtsstörung durch fehlende Expression im Innenohr, arterieller Hypotonie durch verminderten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur sowie verlangsamter Darmperistaltik aufgrund

gestörter Schrittmacherfunktion der Cajal-Zellen (75, 80). Wegen seiner vielfältigen funktionellen Bedeutung in unterschiedlichen Geweben wurde eine Funktionsverlustmutation von NKCC1 im Menschen als embryonal letal angesehen (69). Kürzlich konnten jedoch *Slc12a2*-Mutationen in zwei Patienten mit einem Syndrom aus sensorineuraler Taubheit und schwerer intestinaler Dysfunktion als Ursache einer monogenetischen Erkrankung identifiziert werden, wodurch eine prinzipielle Rekapitulation des in Tierversuchen beschriebenen Phänotyps erfolgte (81, 82). In beiden Studien wurden keine ZNS-spezifischen Symptome berichtet.

Im Gegensatz zum Verlust der NKCC1-Funktion stellt ein verstärkter einwärtsgerichteter Cl⁻-Transport durch gesteigerte NKCC1-Abundanz oder -Phosphorylierung trotzdem einen potenziellen Mechanismus der Entstehung synaptischer Übererregbarkeit unter CNI-Therapie dar. In der Pathophysiologie der Entstehung von Krampfanfällen nach Schädel-Hirn-Trauma sowie pharmakoresistenten, neonatalen Krampfanfällen besitzt die intrazelluläre Cl⁻-Akkumulation durch pathologisch gesteigerte NKCC1-Funktion einen zentralen Stellenwert (83-85). Darüber hinaus werden nierenspezifische UAW der Calcineurin-Inhibition durch die SPAK/OSR1-abhängige Überaktivierung der renalen NKCC2- und NCC-Transporter vermittelt (21, 22, 28). Im ZNS könnten CNI potenziell über einen ähnlichen Mechanismus zu NKCC1-Aktivierung, neuronaler Cl⁻-Akkumulation und synaptischer Übererregbarkeit führen. Für die Evaluation der CNI-induzierten Effekte auf die posttranslationale Regulation von NKCC1 und KCC2 im ZNS ist die Kenntnis des WNK-SPAK/OSR1-Signalwegs daher von entscheidender Bedeutung.

1.4 Der WNK-SPAK/OSR1-CCC-Signalweg

1.4.1 WNK-Kinasen

Die WNK- (*with no lysine* [K]) Kinasen gehören zur Familie der Serin-/Threoninkinasen und sind in Säugetieren durch die vier Isoformen WNK1-4 vertreten (86). Alle vier Isoformen werden in kortikalen Neuronen exprimiert, wobei WNK2 in adulten Organismen die einzige ZNS-spezifische Isoform darstellt (87). Der Name der WNK-Kinasen geht auf eine gemeinsame, charakteristische Eigenart zurück: Die katalytisch aktive Subdomäne II, welche typischerweise in anderen Serin-/Threoninkinasen die AS Lysin zur ATP-Bindung benötigt, weist in ihrer Sequenz kein Lysin auf (86), stattdessen ist dieses in der Subdomäne I zu finden. Eine weitere Besonderheit der WNK-Kinasen ist ihre direkte Regulation durch die intrazelluläre Chloridkonzentration ($[Cl^-]_i$). Eine hohe $[Cl^-]_i$ in ihrer Umgebung hemmt die Autophosphorylierung der Kinasen durch Bindung an das aktive Zentrum und führt zu einer verringerten katalytischen Aktivität (88, 89). Aufgrund ihrer Cl⁻-abhängigen Funktion nehmen WNK-Kinasen in exprimierenden Zellen die Rolle eines Cl⁻-Sensors ein und steuern Signalwege, die die Volumenregulation und Cl⁻-

Homöostase der Zelle beeinflussen (90). Die wichtigsten Substrate, welche als Bindeglied zwischen WNK-Kinasen und membranständigen Transportern fungieren, sind die beiden eng verwandten Kinasen SPAK und OSR1 (91).

1.4.2 Die Kinasen SPAK und OSR1

SPAK und OSR1 sind im ZNS ubiquitär exprimierte Mitglieder der Familie der Serin-/Threoninkinasen, die sich durch eine hohe Sequenzhomologie und evolutionäre Konservierung auszeichnen (42). Neben einem fast identischen Molekulargewicht (SPAK ~60 kDa, OSR1 ~58 kDa) weisen beide Kinasen weitere strukturelle Ähnlichkeiten auf. Sie besitzen eine N-terminale Prolin-/Alanin-reiche Region, die als PAPA-Box bezeichnet wird und für die subzelluläre Lokalisation der Kinasen relevant ist (54). Außerdem können die beiden Kinasen in der sich anschließenden katalytischen Domäne WNK-vermittelt an Threoninresten in der sogenannten T-Schleife phosphoryliert und aktiviert werden (T243 bei SPAK, T185 bei OSR1) (92). Auch die aktivitätspotenzierende Phosphorylierung im Serin-Motiv (S383 bei SPAK, S325 bei OSR1) erfolgt durch WNK-Kinasen, wobei diese Phosphorylierung nicht zwingend notwendig für die basale SPAK/OSR1-Aktivierung ist (93). Beide Kinasen besitzen eine konservierte C-terminale Region, die die Interaktion mit dem RFX(V/I)-Bindungsmotiv in WNK-Kinasen und Substraten ermöglicht (54).

Allgemein betrachtet besteht die Funktion von SPAK/OSR1 in der WNK-abhängigen Regulation von Zellvolumen, transepitheliale Ionentransport und zellulärer Cl⁻-Homöostase durch Phosphorylierung von CCCs der SLC12-Familie (s. Abbildung 4) (91, 94, 95). Hierbei ist der Effekt der SPAK/OSR1-vermittelten Phosphorylierung reziprok: N(K)CC-Transporter werden durch sie aktiviert, während KCC-Transporter gehemmt werden (94). Stimuli, die den WNK-SPAK/OSR1-Signalweg aktivieren, sind beispielsweise ein hyperosmotischer Extrazellulärraum oder eine niedrige [Cl⁻]_i, während ein hypotoner, kaliumreicher Extrazellulärraum oder eine hohe [Cl⁻]_i inhibierend wirken (42). Durch den so induzierten Import oder Export von Ionen und Wasser kompensieren Zellen osmotischen Stress, der ansonsten in ihrer Schwellung oder Schrumpfung resultieren würde (96).

In Neuronen führt die SPAK/OSR1-vermittelte Phosphorylierung von KCC2 und NKCC1 an ihren C- bzw. N-terminalen Threoninen zu einer Erhöhung der [Cl⁻]_i und somit zu veränderter synaptischer Inhibition (s. Abbildung 4) (57, 94). KCC2 wird zusätzlich durch Serin- und Tyrosinphosphorylierung reguliert, welche durch weitere Kinasen vermittelt sind (57). Eine Übersicht über die beteiligten Kinasen und Phosphatasen sowie Phosphorylierungsstellen gibt der folgende Abschnitt.

1.5 Die posttranslationale Regulation von KCC2 und NKCC1

Die Transportaktivität von KCC2 und NKCC1 hängt von der Präsenz ihrer aktivierten Formen in der Zellmembran ab. Hierbei spielt die Phosphorylierung durch den WNK-SPAK/OSR1-Signalweg eine entscheidende Rolle. Durch diesen Mechanismus werden Schwankungen der $[Cl^-]_i$ sowie der Osmolarität in kortikalen Neuronen kompensiert (s. Abbildung 4).

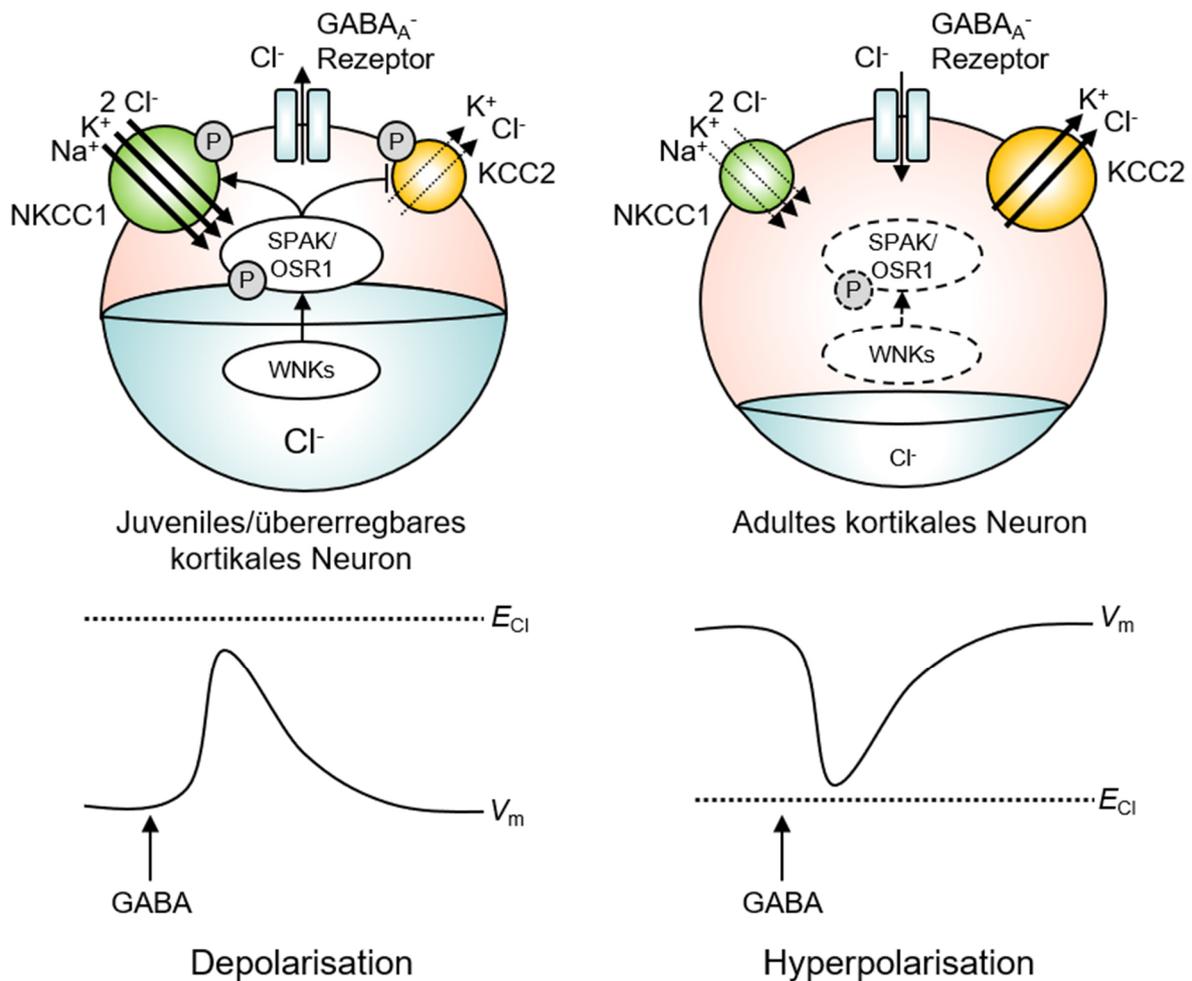


Abbildung 4: Neuronale Erregbarkeit in Abhängigkeit von $[Cl^-]_i$ und CCC-Funktion

Oben: Ein juveniles oder pathologisch übererregbares Neuron (links) und ein adultes Neuron (rechts) sind schematisch dargestellt. Die WNK-SPAK/OSR1-abhängige Phosphorylierung von NKCC1 und KCC2 reguliert die $[Cl^-]_i$. Unten: Durch intrazelluläre Cl^- -Akkumulation mit konsekutiver Verschiebung des Cl^- -Umkehrpotenzials (E_{Cl}) reagieren juvenile und übererregbare Neurone mit einem pathologischen depolarisierenden Cl^- -Ausstrom auf GABA. Das Membranpotenzial (V_m) vor GABAerger Stimulation entspricht in beiden Schemata dem physiologischen Ruhemembranpotenzial. Ursache kann eine verminderte KCC2- oder vermehrte NKCC1-Funktion sein. Angelehnt an Kahle et al. (44).

Zahlreiche Phosphorylierungsstellen des KCC2-Transporters wurden in vorherigen Studien charakterisiert, wobei fünf AS eine funktionelle Relevanz zugeschrieben wird (s. Abbildung 3): T906, T1007, S940, Y903 und Y1087 (57). Eine Aktivierung des WNK-SPAK/OSR1-Signalwegs

vermittelt die inhibitorische T906/T1007-Phosphorylierung (94). In embryonalen Stammzellen, welche KCC2, SPAK und OSR1 endogen exprimieren, führt der Knock-in von phosphorylierungsinkompetenten SPAK/OSR1-Konstrukten (OSR1^{185A/185A}/SPAK^{243A/243A}) zu verminderter KCC2-T1007-Phosphorylierung, wodurch die basale KCC2-Transportaktivität im Vergleich zum WT gesteigert wird (94). Kürzlich veröffentlichte *in vivo* Studien unterstreichen zudem die enorme Bedeutung der KCC2-Threoninphosphorylierung für die neuronale Erregbarkeit in Säugetieren (97-99). In Mäusen führt die phosphomimetische Substitution von Glutamat anstelle von Threonin (T906E/T1007E) zu einem konstitutiv inaktiven KCC2-Transporter und induziert einen epileptischen Phänotyp (97, 98). Homozygote *Kcc2*^{E/E}-Mäuse entwickeln generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle nach taktiler Stimulation und weisen eine verminderte neuronale Cl⁻-Extrusionskapazität auf (97, 98). In einem weiteren Mausmodell führt im Gegensatz dazu die Substitution von Alanin (T906A/T1007A), welche den dephosphorylierten und somit aktivierten Zustand von KCC2 imitiert, zu einer früheren Etablierung hyperpolarisierender GABAerger Transmission (99, 100). Die Dephosphorylierung der beiden Threonine 906 und 1007 erfolgt vermutlich durch PP1 sowie PP2A (101).

Die einzige bekannte aktivierende KCC2-Phosphorylierungsstelle S940 wird in Abhängigkeit von Proteinkinase C (PKC) und PP1 reguliert (102). Die Phosphorylierung an S940 ist durch PKC-Aktivatoren induzierbar, aktiviert KCC2 und stabilisiert ihn in der neuronalen Plasmamembran. Die Dephosphorylierung von S940 führt hingegen zu vermehrter Internalisierung und lysosomaler Degradation des Transporters (103, 104).

Kontroverser diskutiert wird die KCC2-Tyrosinphosphorylierung, welche durch Tyrosinkinasen wie die Src-Kinase (*Sarcoma*-Kinase) vermittelt wird (57). Lee et al. zeigten, dass vermehrte Y903/Y1087-Phosphorylierung in lysosomaler Degradation von KCC2 in HEK293-Zellen und kultivierten hippocampalen Neuronen resultiert (105). Im Gegensatz dazu beschrieben Wake et al. eine Verminderung der Transportaktivität nach Dephosphorylierung von Y903/Y1087 (106), wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass dies durch unspezifische Induktion von oxidativem Stress mittels Wasserstoffperoxids erfolgte. Es ist also unklar, ob die verminderte Tyrosinphosphorylierung Ausdruck einer reduzierten KCC2-Funktion ist oder einem Kompensationsmechanismus entspricht. Für eine primär inhibitorische Funktion der KCC2-Tyrosinphosphorylierung sprechen außerdem die Ergebnisse aus Versuchen mit genetisch modifizierten HEK293-Zellen. Die nicht phosphomimetische Substitution von Phenylalanin anstelle der beiden Tyrosine (Y903F/Y1087F) resultiert in vermehrter KCC2-Abundanz sowie verminderter Internalisierung und Degradation (105). Allerdings ist dieser Effekt nicht durch distinkte Phenylalanin-Substitution (Y903F oder Y1087F) reproduzierbar (105) und wurde bisher

nicht mithilfe von genetisch modifizierten Tiermodellen bestätigt. Zusammenfassend ist die KCC2-Tyrosinphosphorylierung vermutlich eher inhibitorisch, auch wenn die Studienlage im Vergleich zur Threonin- oder Serin-Phosphorylierung weniger eindeutig ist.

Auch für die Regulation der NKCC1-Funktion ist die Aktivität des WNK-SPAK/OSR1-Signalwegs von zentraler Bedeutung. SPAK/OSR1-vermittelte Phosphorylierung der N-terminalen T212/217-Stelle aktiviert den Transporter, während PP1-vermittelte Dephosphorylierung inhibierend wirkt (42). Ein hyperosmolarer Extrazellulärraum sowie eine niedrige $[Cl^-]$; sind die wichtigsten Stimulatoren der regulierenden Kinasen (69). Die Interaktion mit SPAK/OSR1 wird durch RFX(V/I)-Motive ermöglicht (s. 1.3.2) (54).

1.6 Der WNK-SPAK-CCC-Signalweg in *Drosophila melanogaster*

Durch ihre einfache genetische Modifizierbarkeit und gute Eignung für Verhaltensexperimente wird die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für eine Vielzahl biologischer Untersuchungen verwendet. Im Rahmen einer Kollaboration mit Aylin Rodan von der University of Utah wurden für dieses Projekt Experimente an einem *Drosophila*-Modell durchgeführt, auf die in der Diskussion Bezug genommen wird. Daher wird an dieser Stelle eine kurze Übersicht über strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten der für das Verständnis relevanten Proteine und Signalwege in *Drosophila* gegeben.

Drei orthologe Calcineurin-Isoformen (CanA1-3) sind in *Drosophila* beschrieben und auch die in Säugetieren bekannte Calcineurin-Funktion als Aktivator des Immunsystems ist evolutionär in *Drosophila* konserviert (107, 108). Obwohl Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie nicht in Invertebraten exprimiert werden, führt die Calcineurin-Inhibition mit CsA oder Tacrolimus zu einer erhöhten Infektions-Suszeptibilität in Fliegenlarven (107), was die prinzipielle Funktionalität von CNI in *Drosophila* suggeriert. Implikationen der Calcineurin-Inhibition für die neuronale Erregbarkeit und die Aktivität des WNK-SPAK-CCC-Signalwegs wurden bisher in *Drosophila* allerdings nicht beschrieben.

Neben Calcineurin ist auch eine rudimentäre Form des WNK-SPAK-CCC-Signalwegs evolutionär in *Drosophila* konserviert, jedoch besitzen Fliegen nur singuläre Orthologe und keine distinkten Isoformen der Kinasen und Transporter (109). WNK1-4 werden durch WNK, SPAK/OSR1 durch Fray, NKCC1/2 durch NKCC und KCC1-4 durch KCC repräsentiert (109). Die basalen Funktionen und Interaktionen dieser Orthologe sind prinzipiell vergleichbar mit denen in Säugetieren. WNK vermittelt die Phosphorylierung von Fray, welches wiederum NKCC und KCC phosphoryliert und so die zelluläre Cl^- -Homöostase reguliert (90).

Im *Drosophila*-ZNS existiert außerdem ein GABA-Rezeptor-Ortholog in Form des *ligand-gated chloride channel complex* (LGCC), welcher die von der $[Cl^-]_i$ abhängige GABAerge synaptische Transmission vermittelt (110). Analog zu Säugetieren erfolgt während der ZNS-Entwicklung in *Drosophila* ein Wechsel der GABAergen Transmission von exzitatorisch zu inhibitorisch (110). Stärke und Polarität der synaptischen Inhibition in adulten Fliegen sind ebenfalls von der KCC-Expression und -Aktivität abhängig. Die genetische oder pharmakologische KCC-Inhibition führt in *Drosophila* zu einer beeinträchtigten GABAergen Inhibition mit konsekutiver Erniedrigung der Krampfschwelle (110, 111). Dies legt nahe, dass die funktionelle Bedeutung des Transporters für die neuronale Erregbarkeit in *Drosophila* vergleichbar mit der in Säugetieren ist.

Aufgrund der strukturellen Konservierung der Phosphatase Calcineurin und des WNK-SPAK-CCC-Signalwegs sowie der funktionellen Ähnlichkeit der von der $[Cl^-]_i$ und KCC-Funktion regulierten GABAergen Inhibition, stellt *Drosophila melanogaster* ein nützliches und prinzipiell geeignetes Modell zur Evaluation phänotypischer Effekte der Calcineurin-Inhibition auf die neuronale Erregbarkeit dar.

1.7 Ziel der Arbeit

Die pharmakologische Inhibition der Phosphatase Calcineurin mit den Medikamenten Cyclosporin A oder Tacrolimus ist fester Bestandteil der Immunsuppression nach Organ- oder Stammzelltransplantation. Durch Unterdrückung des NFAT-Signalweges in T-Lymphozyten reduzieren Calcineurin-Inhibitoren die zielgerichtete Immunreaktion des Empfängers gegen das Transplantat und verhindern so eine Abstoßung. Dieser Effekt wird jedoch mit zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen erkauft, die auf die Calcineurin-Inhibition in anderen Zellen als T-Lymphozyten zurückzuführen sind. Sowohl die Nephro- als auch die Neurotoxizität stellen hierbei klinisch besonders relevante Probleme dar und können derzeit nur durch eine Reduktion der Calcineurin-Inhibitor-Dosis oder den Wechsel auf andere Präparate behandelt werden.

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in Bezug auf das Verständnis der nierenspezifischen Nebenwirkungen von Calcineurin-Inhibitoren gemacht. Zahlreiche Studien konnten die Entstehung von arteriellem Hypertonus und Hyperkaliämie unter Therapie mit Cyclosporin A oder Tacrolimus auf die Aktivierung von renalen Kationen-Chlorid-Kotransportern zurückführen. Insbesondere die vom WNK-SPAK/OSR1-Signalweg vermittelte, gesteigerte Phosphorylierung der Transporter, die in exzessiver Salzresorption und Wasserretention resultiert,

ist hierfür relevant. Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu evaluieren, ob ähnliche Effekte der Calcineurin-Inhibition auch im zentralen Nervensystem nachweisbar sind.

Im Mittelpunkt der Betrachtung steht hierbei der Kalium-Chlorid-Kotransporter Typ 2, der für die physiologische Funktion der inhibitorischen synaptischen Transmission unentbehrlich ist. Durch die Etablierung einer niedrigen neuronalen Chloridkonzentration generiert er einen transmembranären Chlorid-Gradienten, durch den die Transmitter GABA und Glycin hyperpolarisierend wirken können. Eine Verminderung seiner Funktion führt zu neuronaler Übererregbarkeit und wird bei pharmakoresistenten Epilepsien und zahlreichen anderen neurologischen Erkrankungen beobachtet.

Experimentell wird in dieser Arbeit der Einfluss der Calcineurin-Inhibition auf die neuronale Chlorid-Homöostase durch elektrophysiologische Studien untersucht. Molekularbiologische Versuche sollen Expression und posttranslationale Modifikationen von relevanten Transportern und Kinasen abbilden. Calcineurin- und SPAK-defiziente Mausmodelle werden eingesetzt, um weitere Einblicke in die Phosphoregulation neuronaler Kationen-Chlorid-Kotransporter zu gewinnen. Anhand von Verhaltensstudien mit genetisch veränderten *Drosophila*-Modellen wird die SPAK-Inhibition als potenzieller Therapieansatz neurotoxischer Effekte der Calcineurin-Inhibitoren diskutiert.

Grundlage für die Entwicklung und klinische Erprobung einer gezielten Therapie der neurologischen Nebenwirkungen von Calcineurin-Inhibitoren ist die Identifizierung eines molekularen Pathomechanismus. Die Forschung daran ist daher von Bedeutung für die Transplantationsmedizin. Darüber hinaus kann durch das Verständnis der Pathophysiologie der GABAergen Disinhibition ein Grundstein für die Entwicklung neuer antiepileptischer Medikamente gelegt werden.

2 Methodik

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Wistar-Ratten und Cyclosporinbehandlung

Die in diese Arbeit einfließenden Versuche erfolgten nach den Richtlinien des *National Institute of Health* sowie unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Tötungsanzeige T0351/11, Tierversuchsantrag G0220/12). Die Haltung der Tiere erfolgte in geschlossenen, klimatisierten Räumen bei 22 °C bis 24 °C mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Für die molekularbiologischen Experimente wurden adulte, männliche Wistar-Ratten mit einem Alter von etwa 12 Wochen und einem Gewicht von mehr als 250 Gramm verwendet. Die 2-Photonen-mikroskopischen sowie elektrophysiologischen Messungen wurden an männlichen Wistar-Ratten zwischen postnatalem Tag (P) 17 und P31 durchgeführt. Für die Versuche mit Knockout-Gewebe wurden Gehirnproben in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt (s. 2.1.2).

Um die zeitabhängigen Effekte von Cyclosporin A zu untersuchen, wurden zwei Behandlungsreihen etabliert. Die akuttherapeutische Gruppe erhielt eine intraperitoneal (i.p.) applizierte Einmaldosis (25 mg/kg KG) des auch für klinische Anwendung geeigneten Präparats Sandimmun® (Cyclosporin A, Novartis), während die Kontrollgruppe stattdessen Cremophor® (Vehikel) erhielt. Eine Stunde nach Verabreichung erfolgte entweder die Tötung mit anschließender Organentnahme oder die Narkotisierung mit konsekutiver *Aorta abdominalis* Perfusionsfixierung. Chronische Effekte wurden nach 14 Tagen täglicher i.p. Gabe von Sandimmun® oder Vehikel in gleicher Dosierung wie in der akuttherapeutischen Gruppe bewertet. Die Tötung erfolgte hierbei etwa 24 Stunden nach Applikation der 14. Dosis, das weitere Prozedere war identisch mit dem der akuttherapeutischen Gruppe.

Zur immunhistochemischen Evaluation der chronischen Effekte von Cyclosporin A wurde außerdem eine weitere 14-tägige Behandlung durchgeführt. Hierbei erhielten Tiere entweder Sandimmun® in therapeutischer (5 mg/kg KG) oder supratherapeutischer (25 mg/kg KG) Dosierung. Die Kontrollgruppe erhielt Cremophor® (Vehikel). Tötung und Perfusionsfixierung erfolgten etwa 24 Stunden nach Gabe der 14. Dosis.

2.1.2 Calcineurin A β ^{-/-} und SPAK^{-/-} Mäuse

Calcineurin A β (CnA β)-defiziente Mäuse wurden am Institut für Pädiatrie des *Children's Hospital Medical Center* (Cincinnati, Ohio, USA) durch J.D. Molkenkin generiert. Das PPP3CB-Gen wurde durch Deletion des Exons 2 ausgeschaltet (112). Für diese Arbeit wurden vier Gehirne männlicher CnA β ^{-/-} Mäuse sowie vier alters- und geschlechtsgepaarter WT-Kontrollen zur Verfügung gestellt. Der CnA β -Knockout wurde in dieser Arbeit experimentell durch Western Blot bestätigt.

SPAK-defiziente Mäuse wurden in der Abteilung für Anästhesiologie des *Vanderbilt University Medical Center* (Nashville, Tennessee, USA) durch E. Delpire und K.B. Gagnon generiert. Das SPAK-Gen wurde durch eine Duplikation des Exons 6 sowie Insertion einer Tyrosinase, Neomycinresistenz und einer 5' Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase unterbrochen (95). Im Rahmen einer Kooperation mit J.A. McCormick (*Oregon Health and Science University*, Portland, Oregon, USA) wurden insgesamt sieben Gehirne SPAK-defizienter Mäuse sowie Kontrollen alters- und geschlechtsgepaarter WT-Mäuse zur Verfügung gestellt. Der SPAK-Knockout wurde experimentell durch J.A. McCormick et al. verifiziert (113) und in dieser Arbeit durch Western Blot bestätigt.

2.2 Organentnahme und Gewebepräparation

2.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung für Immunhistochemie

Für die morphologische Untersuchung der Gehirne wurden männliche Wistar-Ratten der entsprechenden Gruppen (WT oder 14 d CsA) einer Perfusion über die *Aorta abdominalis* unterzogen (114). Hierzu wurden die Tiere mittels i.p. Applikation von Pentobarbital (Nembutal, 0,06 mg/g KG) narkotisiert. Daraufhin erfolgten die Eröffnung der Peritonealhöhle sowie die Freipräparation und das proximale Abklemmen der *Aorta abdominalis*, gefolgt von der Eröffnung des Gefäßes distal des Abgangs der Nierenarterien. Ein Polyethylenschlauch wurde über die Inzision eingeführt, mit einem Faden fixiert und mit dem Perfusionssystem verbunden. Der Blutfluss wurde durch das Lösen der proximalen Klemme und die Eröffnung der *Vena cava inferior* zum Druckausgleich freigegeben. Anschließend erfolgte die Perfusion des Gehirns retrograd über die *Aorta abdominalis*. Zunächst wurde eine Vorspüllösung (300 mosmol/l PBS/Sucrose; pH 7,35) für 30 Sekunden eingeleitet, um das Blut aus dem Gefäßsystem des Tieres zu entfernen. Daraufhin erfolgte die eigentliche Fixierung durch die Applikation von 3%-igem Paraformaldehyd in PBS (Fixierlösung) über fünf Minuten. Während dieser Zeit betrug der Perfusionsdruck konstant 1,5 m Wassersäule.

2.2.1.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Das perfundierte Gewebe wurde über Nacht bei 4 °C in der Perfusionslösung nachfixiert und bis zur weiteren Verwendung in 330 mosmol/l Sucrose/PBS-Lösung mit 0,02% Natriumazid gelagert, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Die Paraffineinbettung erfolgte am Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte. Paraffinblöcke wurden bei RT aufbewahrt und vor dem Schneiden für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert, um Schnittartefakte zu reduzieren. Mit einem Mikrotom (Leica RM 2125RT; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) wurden 4 µm starke Schnitte erzeugt, die bei 37 °C im Wasserbad geglättet und auf Objektträger aufgezogen wurden.

2.2.2 Organentnahme für biochemische Versuche

Adulte, männliche Wistar-Ratten wurden mittels Inhalation von Isofluran betäubt und durch Dekapitation getötet. Der Schädel wurde eröffnet und das Gehirn nach scharfem Absetzen von Hirnstamm und frontalen Hirnnerven entnommen. Anschließend wurden die Hirnhäute durch vorsichtiges Rollen auf gekühltem, angefeuchtetem Filterpapier entfernt. Um die Aufbereitung für unterschiedliche Experimente zu ermöglichen, wurden die beiden Hemisphären durch einen Mediansagittalschnitt scharf separiert.

2.2.2.1 Gewebeaufbereitung zur Genexpressionsanalyse

Das erhaltene Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Mörser und Stößel gemahlen und mit TRIzol vermengt (s. 2.6.1).

2.2.2.2 Gewebeaufbereitung für Western Blot und Immunpräzipitation

Großhirnhemisphären wurden in den entsprechenden Homogenisierungs- oder Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer, s. Tabelle 8) transferiert, mittels Ultra-Turrax dispergiert und durch anschließenden Ultraschall (3x3 Impulse, Cycle: 70) homogenisiert. Zur Entfernung nicht gelöster Gewebereste wurde eine 15-minütige Zentrifugation bei $800 \times g$ und 4 °C durchgeführt. Die Proteinfraction befand sich in der wässrigen Phase und wurde als Proteinlysate weiterverwendet (s. 2.5.2 und 2.5.3)

2.2.3 Anästhesie und Präparationstechnik zur Herstellung kortikaler Hirnschnitte

Adulte, männliche Wistar-Ratten wurden mittels Inhalation von Diethylether oder Isofluran bis zum vollständigen Verlust des Blinkreflexes narkotisiert und dekapitiert. Unmittelbar danach erfolgte die möglichst schnelle und schonende Freipräparation eines den sensomotorischen Cortex beinhaltenden Gehirnblocks sowie der Transfer in eisgekühlte, carbogenbegaste künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, s. Tabelle 8). Nach etwa einer Minute wurden die Hirnblöcke mit

Cyanoacrylat-Kleber auf dem Teller des Vibratoms (HM650V, MICROM International, Walldorf) fixiert und in carbogenbegaster ACSF (4 °C) koronar mit einer nominellen Dicke von 400 µm geschnitten. Für die Versuche mit dem 2-Photonen-Mikroskop wurde zum besseren Erhalt der Morphologie in den oberflächlichen Schichten der Schnitte ein anderes Vibratom (VT1200 S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) verwendet, bei dem die Auslenkung der Klinge in Z-Richtung kompensiert werden kann (Leica Vibrocheck™). Des Weiteren wurde hier die Schnittdicke auf 250 µm reduziert. Jeder angefertigte Schnitt wurde zur Erholung für 30-45 min in ca. 33 °C warmer, carbogenbegaster ACSF gelagert. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung bis zur Messung in carbogenbegaster ACSF bei RT.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

Alle Lösungen (Osmolarität 300-310 mosmol/l, pH 7,4) wurden während des Versuchs mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂) begast. Kalibrierungslösungen für die 2-Photonenmikroskopie wurden mit Kaliumglukonat auf eine Osmolarität von 310 mosmol/l titriert.

2.3.1 Intrazelluläre Ableitungen mittels scharfer Mikroelektroden

Messungen mit scharfen Mikroelektroden wurden nach dem Protokoll von Deisz *et al.* (56) durchgeführt. 400 µm starke koronare, neokortikale Hirnschnitte (s. 2.2.3) wurden in eine *Submerged-Type* Messkammer transferiert und mit ~5 ml/min 32°C warmer ACSF perfundiert. Kortikale Schicht II/III Neurone wurden mit 1 M KCl (pH 7,2, 80-100 MΩ) gefüllten, scharfen Mikroelektroden aus Borsilikatglas penetriert, welche mit einem SEC10L Verstärker verbunden waren. Für den Einschluss von Neuronen in die Messreihe wurden folgende Kriterien angewendet: Reguläres Feuerverhalten, Aktionspotenzialamplitude >70 mV, Ruhemembranpotenzial < -60 mV sowie Eingangswiderstand >10 MΩ. Distale postsynaptische Potenziale (PSPs) wurden durch einen in seiner Intensität konstanten, elektrischen Stimulus (2-20 V, 100 µs, 0,2 Hz oder niedriger) evoziert. Hierfür wurde eine extrazelluläre, bipolare Elektrode innerhalb eines Abstands von 400 µm zur apikalen Seite des Somas der gemessenen Zelle positioniert. Um IPSPs zu isolieren, wurden AMPA/Kainat- (10 µM CNQX) und NMDA- (20 µM D-APV) Rezeptorantagonisten appliziert.

2.3.1.1 Bestimmung der Chlorid-Extrusions-Zeitkonstante

Zur Evaluation der Effekte von Cyclosporin A auf neuronale Chlorid-Ausschleusungsmechanismen wurden Hirnschnitte entweder für 1h in 10 µM CsA-haltiger ACSF oder in DMSO-haltiger ACSF inkubiert und in die Messkammer transferiert. Intrazelluläre Messungen der IPSP_A-Amplitude nach iontophoretischer Cl⁻-Beladung (1 nA, 1 min) über eine

KCl-gefüllte scharfe Mikroelektrode wurden unter pharmakologischer Isolation des IPSP_A (s.2.3.1) durchgeführt. Hierbei wurde die konsekutive Verkleinerung der IPSP_A-Amplitude nach Beendigung der Cl⁻-Beladung durch eine monoexponentielle Zerfallsfunktion beschrieben und die Zerfallskonstante τ als Maß für die Chlorid-Ausschleusung verwendet (56).

2.4 2-Photonen-Fluoreszenzlebenszeit-Messungen mit MQAE

Mittels 2-Photonen-Fluoreszenzlebenszeit-*Imaging* (FLIM) und dem chloridsensitiven Farbstoff 1-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinoliniumbromid (MQAE) kann die neuronale intrazelluläre Chloridkonzentration $[Cl^-]_i$ quantifiziert werden (115). In Anwesenheit von Cl⁻ kommt es zur dynamischen Fluoreszenzauslöschung (*Quenching*) der MQAE-Fluoreszenz durch Zusammenstöße zwischen MQAE-Molekülen und Cl⁻-Ionen, wobei das MQAE-Molekül intakt bleibt. Daraus resultiert eine kürzere MQAE-Fluoreszenzlebenszeit bei höheren $[Cl^-]$ und umgekehrt eine längere MQAE-Fluoreszenzlebenszeit bei niedrigeren $[Cl^-]$. Zur Umrechnung von Fluoreszenzlebenszeiten in absolute $[Cl^-]$ wurde eine Kalibrierung (s. 2.4.1.2) durchgeführt.

2.4.1.1 Aufbau des 2-Photonen-FLIM Setups

FLIM-Messungen wurden mit dem 25 \times -Objektiv (HCX IRAPO L 25 \times / NA 0,95, Wasserimmersion) des DMI6000 TCS SP5 2-Photonen-Mikroskops (Leica Mikrosysteme, Mannheim) durchgeführt. In das FLIM-Setup wurde ein gepulster *Chameleon XR* Titan-Saphir-Laser (Coherent Inc., Santa Clara, USA) eingekoppelt, der bei einer Wellenlänge von 780 nm eine Pulsrate von 90 MHz, eine Pulsdauer von <140 fs und eine Leistung von 1,5 W aufwies. FLIM-Bilder wurden mit Spcm64 9.63 Software generiert und mittels SPCImage 6.0 Software ausgewertet.

2.4.1.2 Kalibrierung mit Nigericin und Tributylzinnchlorid

Um die Beziehung zwischen MQAE-Fluoreszenzlebenszeit und $[Cl^-]$ zu bestimmen, wurde ein modifiziertes Kalibrierungsprotokoll basierend auf der Arbeit von Krapf et al. (116) etabliert. Hierfür wurden koronare, neokortikale Hirnschnitte mit Lösungen definierter $[Cl^-]$ (s. Tabelle 8) umspült und die resultierende MQAE-Fluoreszenzlebenszeit in Schicht V Pyramidenzellen gemessen, um so eine Eichgerade zu generieren. Zum Equilibrieren der intra- und extrazellulären $[Cl^-]$ sowie zur Konstanthaltung des pH-Wertes erfolgte die Messung in Anwesenheit des Cl⁻/OH⁻-Antiporters Tributylzinnchlorid (TBT) und des K⁺/H⁺-Ionophors Nigericin. Der transmembranäre Cl⁻-Gradient wurde durch TBT equilibriert, während im Austausch OH⁻-Ionen exportiert wurden. Verschiebungen des pH-Wertes wirkte der Austausch intrazellulärer H⁺-Ionen gegen extrazelluläre K⁺-Ionen durch Nigericin entgegen. Für jede der zu kalibrierenden $[Cl^-]$

wurden MQAE-behandelte Hirnschnitte für 20 min in ACSF mit 10 μM Nigericin und 40 μM TBT inkubiert. Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit in Schicht V Pyramidenzellen wurde nach 20-minütiger Perfusion mit der entsprechenden Kalibrierungslösung bestimmt. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens drei separate Schnitte verwendet und die jeweiligen Fluoreszenzlebenszeiten gemittelt, um die Fluktuation der Messwerte zu minimieren. Die Beziehung zwischen der Fluoreszenzlebenszeit eines Farbstoffs und der Konzentration seines *Quenchers* (in diesem Fall Cl^-) wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_{SV} \times [Q]$$

F_0 stellt die Fluoreszenzlebenszeit eines Farbstoffs in Abwesenheit des *Quenchers* (0 mM Cl^-) dar, während F die jeweiligen Fluoreszenzlebenszeiten in Anwesenheit des *Quenchers* in verschiedenen Konzentrationen (hier 10 mM, 20 mM, 30 mM und 40 mM Cl^-) repräsentiert. $[Q]$ ist die Konzentration des *Quenchers*, K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante. Wird $(F_0/F) - 1$ als Funktion von $[Q]$ dargestellt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die Steigung der resultierenden Gerade entspricht K_{SV} und betrug $9,23 \text{ mol}^{-1}$.

2.4.1.3 Messung der MQAE-Fluoreszenzlebenszeit unter CsA-Einwaschung

Zur Evaluation der akuten Effekte von Cyclosporin A auf die neuronale $[\text{Cl}^-]_i$ wurden koronare, neokortikale Hirnschnitte (s. 2.2.3) für 20 min bei 34 °C in ACSF mit 6 mM MQAE inkubiert (117) und zur Kontrastverstärkung für 20-60 min bei RT in ACSF gewaschen. Anschließend wurden sie in die Messkammer des 2-Photonen-Mikroskops überführt, wo sie mit $\sim 5 \text{ ml/min}$ 34 °C warmer ACSF perfundiert wurden. Die Messung der Fluoreszenzlebenszeiten in Schicht V Neuronen des Neocortex erfolgte jeweils nach einer 10-minütigen Equilibrierungsphase in der Messkammer, nach Applikation von 10 μM CsA-ACSF über 60 min sowie 20 min nach dem Auswaschen mit CsA-freier ACSF. Um auszuschließen, dass eine längere Verweildauer in der Messkammer die $[\text{Cl}^-]_i$ erhöht, wurden parallel Kontrollexperimente mit ACSF-perfundierten Schnitten ohne CsA durchgeführt, bei denen sich kein zeitabhängiger Anstieg der $[\text{Cl}^-]_i$ zeigte. Generierte FLIM-Bilder wurden mit SPCImage analysiert.

2.4.1.4 Analyse mit SPCImage

Eine repräsentative Stelle des FLIM-Bildes mit hoher Anzahl registrierter Photonen (Amplitude idealerweise $>10^5$) wurde als Referenzpunkt gewählt. Die gezählten Photonen in Bezug zur Zeit nach 2-Photonen-Stimulation wurden als monoexponentielle Zerfallsfunktion beschrieben. Nach Vorbild dieser Zerfallsfunktion wurde das restliche Bild in eine sogenannte Zerfallsmatrix

konvertiert, in der die für jeden Pixel errechneten Zerfallskonstanten τ durch Fehlfarben repräsentiert wurden. Klar als pyramidale Neurone identifizierbare Zellen wurden als *Region of Interest* (ROI) definiert und die mittlere Zerfallskonstante (entspricht F in der Stern-Volmer-Gleichung) in ns für jede ROI ermittelt. Die Berechnung der daraus resultierenden $[Cl^-]$ erfolgte mittels OriginLab 2019 Software per Integration der Messwerte in die Stern-Volmer-Gleichung mit der durch Kalibrierung bestimmten K_{sv} von $9,23 \text{ mol}^{-1}$.

2.5 Proteinanalytische Methoden

2.5.1 Immunhistochemie

Für die konfokalmikroskopische Lokalisierung relevanter Proteine wurden in Paraffin eingebettete Großhirnhemisphären zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100%-70%) rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 6 min in Zitratpuffer (s. Tabelle 8) gekocht und zum Abkühlen in PBS gestellt. Nach einem weiteren 5-minütigen Waschschrift in PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Antigene für 30 min in 5% Milch/PBS oder 5% BSA/PBS. Der jeweilige Primärantikörper (s. Tabelle 3) wurde in der zuvor ermittelten Konzentration mit dem besten Signal-Hintergrund-Verhältnis im Blockiermedium verdünnt, aufgetragen und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen in PBS entfernt. Fluoreszenzgebundene Sekundärantikörper (s. Tabelle 4) wurden im Blockiermedium 1:2000 verdünnt und für 2 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Zur Identifikation von Zellkernen erfolgte die 10-minütige Inkubation mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI). Danach wurden die Präparate abermals mit PBS gewaschen sowie mit 67% Glycerin/33% PBS eingedeckelt. Konfokalmikroskopische Bilder wurden mit dem 40 \times -Objektiv (EC-Plan-NEOFLUAR 40 \times / NA 1,3, Ölimmersion, DIC M27) des Zeiss LSM 5 Exciter Mikroskops (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) generiert und mittels ImageJ 2.0 Software hinsichtlich Lokalisation und Intensität der Signale ausgewertet. Die Generierung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte für Schnitte desselben Experiments mit den gleichen Einstellungen innerhalb weniger Tage, um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.5.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde mit dem Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Grundlage des Assays ist die Biuret-Reaktion. Diese basiert auf der Reduktion von zweiwertigen zu

einwertigen Kupferionen in der Gegenwart von Peptidbindungen und der daraus resultierenden Bildung eines blau-violetten Farbstoffkomplexes mit Bicinchoninsäure (BCA). Die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge erfolgt hierbei über eine photometrische Absorptionsmessung, da sich die Extinktion des entstandenen Komplexes bei 560 nm proportional zur Proteinkonzentration verhält (118). Als Standard wurde eine Eichgerade der Extinktion bei unterschiedlichen BSA-Konzentrationen generiert.

2.5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Postnukleäre Proteinlysate wurden mit Homogenisierungspuffer (s. Tabelle 8) auf eine Konzentration von 50 µg/µl titriert. Form und Ladung der Proteine wurden durch Zugabe von 4x Laemmli-Puffer (s. Tabelle 8) sowie Erhitzen bei 65 °C für 15 min oder 95 °C für 5 min vereinheitlicht. Dieser Reduktions- und Denaturierungsprozess unterbindet die Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen und schafft die Grundlage für die molekulargewichtsabhängige Auftrennung der Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (119). Die elektrophoretische Separation erfolgte in 10%-igen Polyacrylamidgelen (s. Tabelle 8) in der Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra Cell in Anwesenheit von Elektrophoresepuffer (s. Tabelle 8). Die angelegte Spannung betrug initial 100 V und wurde bei sichtbarer Auftrennung des eingesetzten Molekulargewichtsstandards auf 120 V erhöht.

2.5.2.3 Western Blot und Blockierung unspezifischer Antigene

Die Übertragung der Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Blotkammer in Anwesenheit von Transferpuffer (0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, *aqua dest.*) über 90 min bei 100 V (120). Die visuelle Erfolgskontrolle zur Beurteilung der Gleichmäßigkeit des Proteintransfers wurde mittels Ponceau-Rot Färbung (0,5% Ponceau S, 1% Essigsäure) und Waschung in *aqua dest.* vollzogen. Die Blockierung freier Bindungsstellen der Membran erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei RT im entsprechenden Blockiermedium. Für die Detektion unphosphorylierter Proteine wurde hierzu 5%-ige Magermilch/PBS oder 5%-iges BSA/PBS verwendet. Für phosphorylierte Proteine hingegen wurde 5% Magermilch/Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween[®] (TBST) oder 5% BSA/TBST eingesetzt, um exzessive Hintergrundfärbung zu vermeiden.

2.5.2.4 Antikörper-Inkubation

Die Identifikation einzelner Proteine erfolgte durch Bindung spezifischer Antikörper. Hierzu wurde zunächst der jeweilige Primärantikörper im Blockiermedium verdünnt und auf die entsprechende Membran gegeben. Phosphospezifische Antikörper wurden zuvor für 1 h bei RT

mit unphosphorylierten Peptiden der Epitopsequenz in zehnfacher relativer Konzentration inkubiert, um die unspezifische Detektion nicht phosphorylierter Proteine auf der Membran zu verringern. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörperreste durch dreimaliges Waschen der Membran für je 5 min in PBST oder TBST entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einem gegen die Spezies des verwendeten Primärantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT im jeweiligen Blockiermedium inkubiert und danach drei Mal mit PBS oder TBS gewaschen. Für eine Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper s. Tabelle 3/ Tabelle 4.

2.5.2.5 Luminolreaktion und Chemilumineszenzdetektion

Die Visualisierung der antikörpermarkierten Banden erfolgte mittels Freisetzung und Detektion von Chemilumineszenz in der Luminolreaktion. Hierzu wurden die Membranen für 1 min mit Luminolreagenz (ECLTM Western blotting detection reagents, GE Healthcare) inkubiert. In dieser Zeit oxidierte die sekundärantikörpergebundene HRP das Luminol und setzte dabei Photonen frei, welche über Autoradiographiefilme detektiert wurden. Diese Filme wurden mit der Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60 unter Einsatz von Fixierer G354 und Entwickler G150 entwickelt. Nach dem Erwerb des *ECL Chemocam Imagers* mit integrierter lichtempfindlicher CCD (*charge-coupled device*)-Kamera wurden Western Blots mit dem neuen System visualisiert. Die densitometrische Evaluation erfolgte mittels AlphaImager 4.0 oder ImageJ 2.0 Software. β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) oder α -Tubulin fungierten als Beladungskontrolle.

2.5.3 Immunpräzipitation

Antikörper gegen WNK2, KCC2, NKCC1 und phosphoryliertes Tyrosin (pY) sowie die als Negativkontrolle fungierenden Immunglobuline gleichen Isotyps wurden nach Angaben des Herstellers mit dem *Dynabeads[®] Antibody Coupling Kit* (Invitrogen) kovalent an *Dynabeads[®] M-270 Epoxy* gebunden. Postnukleäre Wistar-Ratten Hirnlysate (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit den antikörpergebundenen *Beads* über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit IP-Puffer (s. Tabelle 8) gefolgt von einem Waschschritt mit erhöhter Salzkonzentration (300 mM NaCl in IP-Puffer). Die *Beads* wurden abschließend zum Lösen der präzipitierten Proteine in 1 \times Laemmli-Puffer gekocht und die so erhaltenen Eluate mittels Western Blot analysiert.

2.6 Genexpressionsanalyse

2.6.1 RNA-Isolation aus Rattenhirngewebe

Die Gesamt-RNA-Isolation wurde mittels Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde gemörsertes Hirngewebe mit 500 μl TRIzol (Thermo Fisher Scientific) versetzt und nach 5 min Inkubation bei RT durch Vortexen mit 100 μl Chloroform vermengt. Zur Trennung der RNA von anderen zellulären Bestandteilen erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei $16.000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$, wobei sich eine wässrige und eine organische Phase bildeten. Die wässrige Phase, die die Gesamt-RNA beinhaltet, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur RNA-Fällung für 10 min bei RT mit 250 μl Isopropanol inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 min bei $16.000 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ wurde der Überstand verworfen und das erhaltene RNA-Pellet zunächst mit 500 μl 70%-igem Ethanol und dann mit 250 μl 100%-igem Ethanol gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei $7.500 \times g$ und $4\text{ }^\circ\text{C}$ mit erneutem Verwerfen des Überstandes. Das so erzeugte Pellet wurde im Thermoblock für 10 min bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und danach mit 20 μl RNase freiem Wasser resuspendiert. Die Lagerung der Gesamt-RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.6.2 cDNA-Synthese

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm mittels Nanophotometer. Für die Synthese von stabiler cDNA durch reverse Transkription wurden 2 μg Gesamt-RNA mit 0,7 μl Random Hexamer Primern versetzt und mit deionisiertem Wasser auf 24 μl aufgefüllt. Durch eine 5-minütige Inkubation bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ im Thermocycler wurde die RNA denaturiert. 16 μl Master-Mix (0,5 μl RNase Inhibitor, 2 μl dNTPs, 8 μl BioScript-Puffer, 5 μl RNase-freies Wasser und 0,5 μl M-MLV Reverse Transkriptase) wurden bei RT hinzugefügt. Die darin enthaltene reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die temperaturabhängig die Gesamt-RNA in cDNA umschreibt. Die Proben wurden hierfür 2 h lang bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkription durch 10-minütiges Erwärmen auf $70\text{ }^\circ\text{C}$ gestoppt. Die erzeugte cDNA wurde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.6.3 Quantitative *Real-Time* PCR mit EvaGreen[®]

Die quantitative *Real-Time* PCR (qPCR) ist ein Verfahren zur Erfassung der Amplifikation einer DNA-Zielsequenz in Echtzeit. Der hierbei eingesetzte Farbstoff EvaGreen[®] emittiert Fluoreszenz, wenn er in DNA interkaliert, in Abwesenheit von DNA hingegen nicht. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaft ist die Fluoreszenzintensität eines EvaGreen[®] qPCR-Ansatzes

proportional zur Menge der generierten DNA, solange genügend Farbstoff vorhanden ist. Da sich die Anzahl der mit spezifischen Primern amplifizierten DNA mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt, wächst auch die Fluoreszenzintensität exponentiell. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzintensität erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird als *Cycle Threshold* (Ct-Wert) definiert und auf den Ct-Wert eines Referenzgens (in dieser Studie GAPDH) normalisiert. So erhaltene Werte können mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert werden und lassen Rückschlüsse auf die Konzentration der ursprünglich isolierten RNA zu (121). Konkret beinhaltete der Ansatz für die qPCR 20 μl , die sich wie folgt zusammensetzten: 10 μl vorverdünnte cDNA, 2 μl 5 \times HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX), 2 μl der entsprechenden Primer (s. Tabelle 2) sowie 6 μl nukleasefreies Wasser. Alle Proben wurden dreifach gemessen und zu jedem Primerpaar eine Negativkontrolle bestimmt, die statt des DNA-Templates nukleasefreies Wasser enthielt. Die Messung erfolgte nach standardisiertem qPCR-Profil (s. Tabelle 1) im Fast 7900 Cycler und wurde mit SDS2.1 Software analysiert. Im Anschluss erfolgte eine Schmelztemperaturanalyse, um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen.

Tabelle 1: qPCR-Profil

	Teilschritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1.	Initiation	50 °C	2 min	-
2.	Denaturierung	95 °C	10 min	-
3.	Denaturierung	95 °C	15 sec	40 Zyklen
4.	Elongation	60 °C	1 min	40 Zyklen

Tabelle 2: Verwendete qPCR Primer

Bezeichnung	Sequenz
KCC2_whole_fwd	5'-CTA CGC AGG GGT CAT CAA GT-3'
KCC2_whole_rev	5'-TCA CCG TCT CAT TTC CTT CC-3'
KCC2a_fwd	5'-GCC GGC TCC CGA GGG AAG-3'
KCC2b_fwd	5'-GCC ACC ATG CTC AAC AAC CT-3'
KCC2a/b_rev	5'-TGA AGG GGC TGC TCT CCT TGG-3'
NKCC1_fwd	5'-CAT GGA TTG TGG GTC AGG CT-3'
NKCC1_rev	5'-GCT CCT CCT CCT CTC ACG AA-3'
OSR1_fwd	5'-AAA GAC GTT TGT TGG CAC CC-3'
OSR1_rev	5'-GCC CCT GTG GCT AGT TCA AT-3'
FL-SPAK_fwd	5'-TGC CAG ACG AGT ATG GAT GA-3'
FL-SPAK_rev	5'-CCA CAG CTC ATC TTT GAC CA-3'
Wnk2_fwd	5'-TGG AGG TAG CAT GGT GTG AA-3'
Wnk2_rev	5'-TGG GGT GCT GTA GAC CTT TC-3'
GAPDH_fwd	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'
GAPDH_rev	5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'

2.7 Material

2.7.1 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind hinsichtlich ihrer Reaktivität und Spezifität für Western Blot und Immunhistochemie gut charakterisiert. Die optimale Konzentration jedes Antikörpers wurde spezifisch für jeden Versuch ermittelt.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für Western Blot und Immunhistochemie

Protein	Spezies	Hersteller/Bezugsquelle	Katalognummer	Verdünnung	
				WB	IH
α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich	T5168	1:1.000	
β -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich	A5441	1:10.000	
CnA β	Kaninchen	Millipore	07-068	1:200	1:50
GAPDH	Kaninchen	Abcam	Ab181602	1:500	
KCC2	Maus	NeuroMab	N1/12	1:1.000	1:500
pKCC2 (S940)	Kaninchen	Phospho Solutions	P1551-940	1:1.000	1:500
pKCC2 (T906)	Schaf	MRC-PPU Reagents, Universität Dundee	S959C	1:200	
pKCC2 (T1007)	Schaf	MRC-PPU Reagents, Universität Dundee	S961C	1:200	
NKCC1	Maus	Developmental Studies Hybridoma Bank	T4	1:1000	1:500
pNKCC1 (T212/T217) (122)	Kaninchen	Laboreigene Herstellung	-	1:1000	
OSR1	Schaf	MRC-PPU Reagents, Universität Dundee	DU2887	1:300	
SPAK	Kaninchen	Cell Signaling Technologies	#2281	1:300	
pSPAK/OSR1 (S383/S325)	Schaf	MRC-PPU Reagents, Universität Dundee	S670B	1:400	1:250
pTyrosin	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Sc-508	1:200	
WNK2	Kaninchen	Novus Biologicals	25910002	1:500	

WB: Western Blot, IH: Immunhistochemie

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Isotyp	Hersteller	Katalog- nummer	Verdünnung	
			WB	IH
Cy TM 3 donkey anti mouse IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	715-165-150		1:300
Cy TM 3 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-165-152		1:300
Cy TM 3 donkey anti sheep IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	713-165-003		1:300
DyLight TM 488 donkey anti rabbit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories	711-485-152		1:300
Polyclonal swine anti rabbit HRP	Dako	P0399	1:2000	
Polyclonal goat anti mouse HRP	Dako	P0447	1:2000	
Polyclonal rabbit anti sheep HRP	Dako	P0163	1:2000	

WB: Western Blot, IH: Immunhistochemie, HRP: Meerrettich-Peroxidase

2.7.2 Enzyme und zugehörige Agenzien

Tabelle 5: Enzyme und zugehörige Agenzien

Enzyme/Puffer	Hersteller	Ort
BioScript TM Reverse Transkriptase & Reaction Buffer (5×)	Bioline GmbH	Luckenwalde
HOT FIREPol [®] EvaGreen [®] qPCR Mix Plus (ROX)	Solis BioDyne	Tartu, Estland
RiboLock RNase Inhibitor	Fisher Scientific	Schwerte

2.7.3 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Firma	Ort
<i>Dynabeads</i> [®] Antibody Coupling Kit Dynal AS	Kovalente Bindung von Antikörpern an <i>Beads</i>	Invitrogen Life Technologies GmbH	Darmstadt
Micro BCA TM Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hennigsdorf

2.7.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller/Bezugsquelle	Ort
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Agar	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	ICN Biomedicals Inc.	Costa Mesa, CA, USA
Bromphenolblau Natriumsalz	SERVA GmbH	Heidelberg
Calciumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Carbogen (95% O ₂ / 5% CO ₂)	Linde	Guildford, Großbritannien
Chloroform reinst	Merck KGaA	Darmstadt
Cremophor	Merck KGaA	Darmstadt
Cyanoacrylat Kleber	B. Braun AG	Melsungen
Cyanquixalin (CNQX)	Tocris Bioscience	Bristol, Großbritannien
Cyclosporin A Injektionslösung (Sandimmun)	Novartis AG	Basel, Schweiz
Cyclosporin A (Pulver)	Santa Cruz Biotechnology GmbH	Dallas, TX, USA
D-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D-APV)	Ascent Scientific	Weston-Super-Mare, Großbritannien
D-Glukose	Merck KGaA	Darmstadt
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Diethylether	Mallinckrodt Baker	Deventer, Niederlande
Difco™ Skim Milk (Milch)	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
dNTPs	Bioline GmbH	Luckenwalde
ECL-Lösung (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare GmbH	München
Entwickler G150	Agfa-Gevaert N.V.	Mortsel, Belgien
Essigsäure	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA	Darmstadt
Fixierer G354	Agfa-Gevaert N.V.	Mortsel, Belgien
Glycerin Rotipuran®	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Isofluran (Forene 100%)	Abbott GmbH & Co. KG	Wiesbaden
Isopropanol	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumglukonat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck KGaA	Darmstadt
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt
MQAE (1-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinoliniumbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Natriumazid	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA	Darmstadt
Nembutal (Pentobarbital)	Fagron	Barsbüttel
Nigericin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA	Darmstadt
PhosSTOP™ Phosphataseinhibitor Tabletten	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Proteinaseinhibitor cocktail tablets, complete	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Random Hexamer Primer	Bioline GmbH	Luckenwalde
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Sucrose	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Tributylzinnchlorid (TBT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Triethanolamin (TEA)	Merck KGaA	Darmstadt
Tris Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck KGaA	Darmstadt
Tris HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)	Merck KGaA	Darmstadt
Triton® X-100	Merck KGaA	Darmstadt
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Scientific	Hennigsdorf
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Xylol	J.T. Baker	Griesheim
Zitronensäure	Merck KGaA	Darmstadt

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5% BSA/PBS	5 g BSA auf 100 ml 1× PBS-Puffer
5% BSA/TBST	1× TBS-Puffer, 0,1% Tween-20, 5% BSA
5% Milch/PBS	5 g Difco™ Skim Milk auf 100 ml 1× PBS-Puffer
5% Milch/TBST	1× TBS-Puffer, 0,1% Tween-20, 5% Milch
ACSF (in mM)	NaCl (124), KCl (5), NaH ₂ PO ₄ (1,25), MgSO ₄ (2), CaCl ₂ (2), NaHCO ₃ (26), D-Glukose (10) in <i>aqua dest.</i>
Aufbewahrungslösung vor Paraffineinbettung	1× PBS/Sucrose mit 0,02% Natriumazid, 330 mosm/l
Elektrophoresepuffer	10×: 0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1% SDS, <i>aqua dest.</i> auf 1 l, pH 8,3
Fixierlösung	3% PFA/ 1× PBS
Gelpuffer	3 M Tris-Base, 0,3% SDS, <i>aqua dest.</i> , pH 8,45
Homogenisierungspuffer	250 mM Sucrose, 10 mM TEA, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette, PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablette, <i>aqua dest.</i> , pH 8,45
IP-Puffer	50 ml: 5 ml 10×TBS, 250 µl Tween-20, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette, PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablette, 45 ml <i>aqua dest.</i>
Kalibrierungslösungen (in mM)	KCl (0/10/20/30/40), Kaliumglukonat (150/140/130/120/110), D-Glukose (10), HEPES (10) in <i>aqua dest.</i>
Laemmlis 4×	252 mM Tris/HCl, 40% Glycerin, 8% SDS, 0,04% Bromphenolblau, 20% β-Mercaptoethanol, pH 6,8
PBS-Puffer	400 g NaCl, 12 g KH ₂ PO ₄ , 89 g Na ₂ HPO ₄ , 10 g KCl auf 5 l H ₂ O
Ponceau S	0,5% Ponceau, 1% Essigsäure, <i>aqua dest.</i>
Sammelgel	1 ml Acrylamid, 2 ml Gelpuffer, 5 ml <i>aqua dest.</i> , 100 µl APS, 10 µl Bromphenolblau, 10 µl TEMED
Trenngel	7 ml Acrylamid, 7 ml Gelpuffer, 2,5 ml Glycerol, 4 ml <i>aqua dest.</i> , 200 µl APS, 10 µl TEMED
TBS-Puffer	10×: 24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl, <i>aqua dest.</i> auf 1 l, pH 7,6
Transferpuffer	10×: 0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, <i>aqua dest.</i> auf 1 l
Vorspüllösung	1× PBS/Sucrose, 300 mosm/l
Zitratpuffer	0,02 M Zitronensäure, 0,09 M Natriumcitrat; pH 6

2.7.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoradiographiefilm FUJIFILM Super RX	Fujifilm Europe GmbH	Düsseldorf
Borosilikat-Glaskapillaren	Hilgenberg	Malsberg
<i>Dynabeads</i> ™ M-270 Epoxy	Thermo Fisher Scientific Inc.	Hennigsdorf

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Falcon Gefäße (15 ml/50 ml)	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
Glasplatten für SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Kryogefäße (2 ml)	Simport	Beloil, Kanada
Nitrocellulosemembran Porablot NCP (0,45 µm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren
Objektträger Super Frost® Plus	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik	Emmendingen
PCR Tubes	Kisker Biotech	Steinfurt
Pipettenspitzen (10 µl/200 µl/ 1000 µl)	Sarstedt	Nümbrecht
qPCR 96 Well Platten (MicroAmp®)	Applied Biosystems	Darmstadt
Ultra Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter GmbH	Krefeld
Whatman-Papier	Whatman GmbH	Dassel

2.7.6 Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Ort
2-Photonen-Mikroskop DMI6000 TCS SP5	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar
Bipolare Elektrode SNEX200X	Science Products	Hofheim
Digitalisierer Digidata 1440A	Molecular Devices	Sunnyvale, CA, USA
ECL Chemocam Imager	INTAS Science Imagine Instruments GmbH	Göttingen
Elektrophoresegerät Bio-Rad Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Filmentwickler Curix 60	Agfa-Gevaert N.V.	Mortsel, Belgien
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG	Hamburg
Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exciter	Carl Zeiss MicroImaging GmbH	Jena
NanoPhotometer	Implen GmbH	München
Kryo-Osmometer OSMOMAT® 030	Gonotec Meß- und Regeltechnik GmbH	Berlin
Paraffinmikrotom Leica RM 2125RT	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar
PCR-Cycler PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc.	San Francisco, CA, USA
pH-Meter Knick 766 Calimatic	Knick	Berlin
Plattenreader Asys Expert 96	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld
Real-time Cycler 7500 Fast	Applied Biosystems	Darmstadt
Rotor SW40Ti	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld
Rotor TLA 100.4	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld

Schwenktisch	Biometra GmbH	Göttingen
Semi-Dry Transferkammer Trans-Blot® SD Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
SDS-Gelgießvorrichtung	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Temperaturkontrolleinheit SCTC 20 E	Npi electronic GmbH	Tamm
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Laborapparate AG	Bäch, Schweiz
Titan-Saphir-Laser Chameleon XR	Coherent Inc.	Santa Clara, CA, USA
Ultraschall (SONOPULS GM70; MS72)	Bandelin electronic	Berlin
Ultra-Turrax/Rotor-Stator-Homogenisator Diax 600	Heidolph Instruments	Schwabach
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld
Verstärker SEC 10L	Npi electronic GmbH	Tamm
Vibratom HM650V	Microm International GmbH	Walldorf
Vibratom Leica VT1200 S	Leica Biosystems GmbH	Wetzlar
Vortexer Vortex-Genie 2, G-560	Scientific Industries Inc.	Bohemia, NY, USA
Waage BP210S	Sartorius	Göttingen

2.7.7 Software

Tabelle 11: Verwendete Software

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Website
AlphaImager	Densitometrie von Western Blots	Alpha Innotech Corporation, CA, USA
BLAST	Datenbank für Nukleotid- und Proteinsequenzen	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ChemoStar Imager 2015	Erfassung von Western Blots	INTAS Science Imagine Instruments GmbH, Göttingen
ImageJ 2.0	Densitometrie von Western Blots, Auswertung Konfokalmikroskopie	National Institute of Health
Inkscape	Vektorgrafik-Editor	www.inkscape.org
Leica Application Suite X	2P-Mikroskopie	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft Office 2016	Textbearbeitung, Statistik, Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
OriginLab 2019	Statistik und Diagramme 2P-FLIM	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
pCLAMP™ 10.5	Datenerfassung Elektrophysiologie	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Primer-BLAST	Primerdesign	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Sequence Detection Systems SDS 2.1	Auswertung von qPCR	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
SPCImage 6.0	Auswertung 2P-FLIM	Becker & Hickl GmbH, Berlin
Spem64 9.63	FLIM-Erfassung	Becker & Hickl GmbH, Berlin
Zen Version 8	Konfokalmikroskopie	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

2.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mittels Microsoft Excel Office Professional Plus 2016 und OriginLab 2019 Software. Zur Auswertung der Immunfluoreszenz-, qPCR- und Western Blot Experimente wurde die Normalverteilung der Messwerte angenommen und Signifikanzen mit einem zweiseitigen Zweistichproben-t-Test determiniert. Für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen im Rahmen der 2P-FLIM-Versuche wurde die Normalität zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test untersucht. Da die Daten des Experiments nicht normal verteilt waren, wurde zur Varianzanalyse der Kruskal-Wallis-Test verwendet und individuelle Gruppenunterschiede *post-hoc* mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben ermittelt. In allen Tests wurden p -Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Wegen des explorativen Charakters der Studie erfolgte keine Anpassung des Signifikanzniveaus für multiples Testen.

3 Ergebnisse

3.1 Cyclosporin A – Modulator der neuronalen Erregbarkeit

Ein Teil der Daten des Abschnitts 3.1.1 basiert auf den Versuchen von Herrn Sebastian Loyola und wurde bereits in der 2014 an der Charité - Universitätsmedizin Berlin von mir verfassten Hausarbeit „Effects of pharmacological calcineurin inhibition on chloride homeostasis in rat neocortex“ beschrieben. Dieser Datensatz wurde von Prof. Rudolf Deisz nach Abschluss der Hausarbeit erweitert und für die Darstellung in dieser Monographie zur Verfügung gestellt.

In vorausgegangenen Studien konnten bereits pathophysiologische Mechanismen hinter der Entstehung von Salzretention und arterieller Hypertonie unter CsA-Therapie nachgewiesen werden (21, 28). So führt die Calcineurin-Inhibition in der Niere unter anderem über Aktivierung der SPAK-Kinase zu veränderter Phosphorylierung von Kationen-Chlorid-Kotransportern (CCC) und stimuliert so die Rückresorption von Salz und Wasser im dicken Teil der aufsteigenden Henle-Schleife sowie im distalen Konvolut (21, 22, 28). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese generiert, dass analog zu renalen CCC-Isoformen auch die im ZNS exprimierten Transporter KCC2 und NKCC1 durch CsA in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

3.1.1 CsA vermindert die neuronale Chloridausschleusung

Die neuronale Erregbarkeit wird maßgeblich durch Stärke und Polarität der GABAergen Transmission in Abhängigkeit von der $[Cl^-]_i$ bestimmt (44). Um prinzipielle Effekte der Calcineurin-Inhibition auf den neuronalen Chloridtransport zu bestimmen, wurden intrazelluläre Ableitungen mit scharfen Mikroelektroden in kortikalen Schicht II/III Pyramidenzellen der adulten Wistar-Ratte erfasst (s. Abbildung 5). Hirnschnitte wurden vor dem Versuch in ACSF mit CsA (10 μ M, 1 h) oder Vehikel (DMSO, 1 h) inkubiert. Zur Bestimmung der Chloridextrusionszeit wurden Neurone durch Applikation eines einwärtsgerichteten Stroms (1 nA, 1 min) über eine mit 1 M KCl gefüllte scharfe Mikroelektrode iontophoretisch mit Chlorid beladen. Anschließend wurden postsynaptische Potenziale durch extrazelluläre, elektrische Stimulation (0,33 Hz) präsynaptischer Axone induziert. Die Abnahme der Amplitude des pharmakologisch isolierten, schnellen inhibitorischen postsynaptischen Potenzials (IPSP_A) bei repetitiver synaptischer Stimulation reflektiert Änderungen der $[Cl^-]_i$ und kann durch eine monoexponentielle Funktion moduliert werden (56). Die daraus abgeleitete Zeitkonstante τ erlaubt Rückschlüsse auf die Kinetik der Cl⁻-Ausschleusung. Präinkubation mit CsA (10 μ M, 1 h) verlängerte τ im Vergleich

zu Vehikel-behandelten Neuronen ($\tau_{\text{Vehikel}} = 7,25 \pm 0,34 \text{ s}$ vs. $\tau_{\text{CsA}} = 10,91 \pm 0,49 \text{ s}$) und suggerierte eine verminderte Cl^- -Extrusion nach CsA-Inkubation.

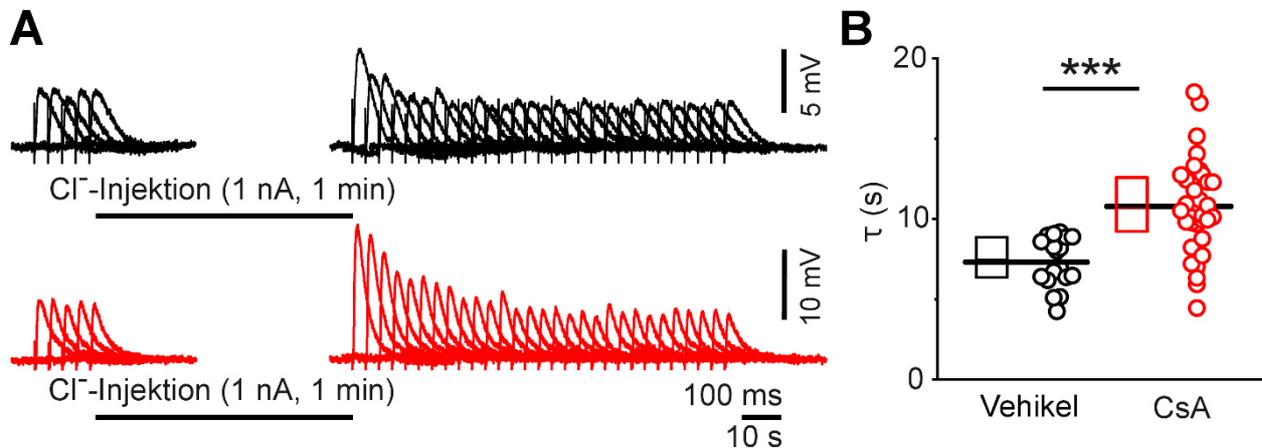


Abbildung 5: Bestimmung der Chloridausschleusungszeitkonstante

(A) Repräsentative *Current-Clamp*-Ableitungen in Schicht II/III Pyramidenzellen der Wistar-Ratte zeigen IPSP_A vor und nach iontophoretischer Chloridbeladung (KCl-Elektrode, 1 nA, 1 min). Präinkubation mit CsA (10 μM , 1 h) verlängerte τ im Vergleich zu Vehikel-behandelten Neuronen ($\tau_{\text{veh}} = 7,25 \pm 0,34 \text{ s}$ vs. $\tau_{\text{CsA}} = 10,91 \pm 0,49 \text{ s}$, $n = 18$ Neurone [Vehikel], $n = 34$ Neurone [CsA]). (B) Box-Plot-Diagramme zeigen den Median \pm 25-75% Interquartilsabstand (IQR) der Zeitkonstanten der Normalisierung der IPSP_A-Amplitude nach iontophoretischer Chloridbeladung. Dicke horizontale Linien repräsentieren den Mittelwert. *** $p < 0,001$, zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

3.1.2 CsA akkumuliert Cl^- in kortikalen Pyramidenzellen

Ob die beobachtete, CsA-induzierte Verminderung des auswärts gerichteten Chloridtransports tatsächlich zu einer intrazellulären Cl^- -Akkumulation führt, wurde nachfolgend überprüft. Zur direkten Erfassung CsA-induzierter $[\text{Cl}^-]_i$ -Veränderungen, wurde die Zerfallskonstante τ der Fluoreszenzlebenszeit des chloridsensitiven Farbstoffs MQAE (τ_{MQAE}) in kortikalen Schicht V Pyramidenzellen der Wistar-Ratte unter Kontrollbedingungen, nach CsA-Einwaschung (10 μM , 1 h) und nach CsA-Auswaschung (20 min, ACSF) bestimmt (s. Abbildung 6). MQAE emittiert bei 2-Photonen-Stimulation Fluoreszenz in Abhängigkeit der umgebenden $[\text{Cl}^-]$, wobei sich im mikroskopischen Bild die chloridarmen Neurone gut vom chloridreichen Extrazellulärraum abheben. Hohe $[\text{Cl}^-]$ verkürzen durch dynamisches *Quenching* die MQAE-Fluoreszenzlebenszeit, während niedrige $[\text{Cl}^-]$ sie verlängern (s. 2.4). Mittels Durchführung von Kalibrierungsexperimenten konnten die so erhaltenen MQAE-Lebenszeiten in absolute $[\text{Cl}^-]$ umgerechnet werden (s. 2.4.1.2). Nach Einwaschen von CsA erhöhte sich die mittlere $[\text{Cl}^-]_i$ in den gemessenen Pyramidenzellen, während sie nach Auswaschen mit ACSF wieder abfiel ($6,32 \pm 0,38 \text{ mM}$ [Kontrolle] vs. $13,19 \pm 0,49 \text{ mM}$ [CsA] vs. $8,22 \pm 0,5 \text{ mM}$ [nach *Wash-out*]). Somit wurde

ein reversibler CsA-induzierter $[Cl^-]_i$ -Anstieg in kortikalen Pyramidenzellen als Folge der beeinträchtigten Cl^- -Extrusion nachgewiesen.

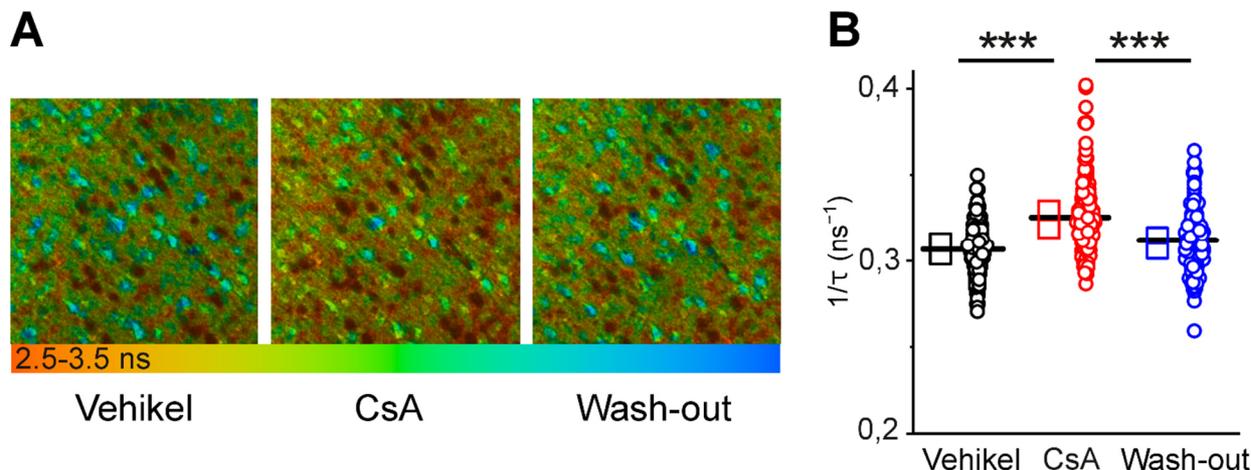


Abbildung 6: 2P-FLIM in MQAE-beladenen Pyramidenzellen

(A) Repräsentative 2P-FLIM-Bilder stellen τ_{MQAE} (Anregung bei 780 nm) in kortikalen Schicht V Pyramidenzellen der Wistar-Ratte unter Kontrollbedingungen, nach CsA-Einwaschung (10 μ M, 1 h) und nach CsA-Wash-out (20 min, ACSF) dar. Die ermittelten Werte werden farbkodiert visualisiert, wobei blaue Farbtöne längeren und rote Farbtöne kürzeren τ_{MQAE} entsprechen. Nach Konvertierung in absolute $[Cl^-]$ zeigte sich eine CsA-induzierte Erhöhung des $[Cl^-]_i$, die reversibel nach 20-minütiger Auswaschung war ($6,32 \pm 0,38$ mM [Kontrolle] vs. $13,19 \pm 0,49$ mM [CsA] vs. $8,22 \pm 0,5$ mM [nach Auswaschung]). (B) Box-Plot-Diagramme zeigen den Median \pm 25-75% IQR der Zerfallsraten der MQAE-Fluoreszenz ($1/\tau_{MQAE}$). Dicke horizontale Linien repräsentieren den Mittelwert. *** $p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; $n = 6$.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CsA die $[Cl^-]_i$ in kortikalen Neuronen wahrscheinlich durch eine Verminderung der Cl^- -Extrusion erhöht. Daraus resultieren potenziell eine verminderte GABAerge Inhibition mit konsekutiv erhöhter neuronaler Erregbarkeit. Die Hypothese, dass die beobachteten Effekte aus einer veränderten Funktion neuronaler CCCs resultieren, benötigte weitere experimentelle Exploration. Ebenso galt es zu überprüfen, welche vorgeschalteten Signalwege potenziell durch Calcineurin-Inhibition beeinflusst werden.

3.2 WNK2 als Interaktionspartner von CnA β , SPAK, KCC2 und NKCC1

Die Substratspezifität von Serin/Threonin-Phosphatasen wie Calcineurin wird durch verschiedene Bindungsmotive in der Aminosäuresequenz von Zielproteinen der Phosphatase gewährleistet (s. 1.2.1). In einer Studie konnte PxIxIT als primäres und LxVP als sekundäres Calcineurin-Bindungsmotiv identifiziert werden, wobei der pharmakologische Effekt von CsA partiell über die Inhibition LxVP-vermittelter Protein-Protein-Interaktionen vermittelt wird (37). Da weder KCC2 noch NKCC1 allerdings derartige Bindungsmotive besitzen, wird ihre Dephosphorylierung

vermutlich nicht durch eine direkte Calcineurin-Interaktion vermittelt. Die Interaktion der beiden Transporter mit Calcineurin könnte jedoch über Gerüstproteine vermittelt werden.

3.2.1 WNK2 enthält evolutionär konservierte Calcineurin-Bindungsmotive

Da aus der Literatur bekannt war, dass WNK-Kinasen als Gerüstproteine fungieren können (123), wurde zunächst eine Analyse der N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen der vier im ZNS exprimierten WNK-Isoformen auf Calcineurin-Bindungsmotive durchgeführt. Hierbei wurde WNK2 als potenzieller Interaktionspartner für Calcineurin identifiziert (s. Abbildung 7), da sowohl in von Nagetieren stammenden als auch in humanen Sequenzen evolutionär konservierte LxVP- und PxIxIT-Motive gefunden wurden. Aufgrund der großen Übereinstimmung mit PxIxIT sowie der vollständigen Konservierung zwischen den Spezies wurde DxIxIT ebenfalls als Calcineurin-Bindungsmotiv angenommen.

Mensch: 321-HRDLK**CDNIFIT**GPTGSVKI-340
 Maus: 321-HRDLK**CDNIFIT**GPTGSVKI-340
 Ratte: 321-HRDLK**CDNIFIT**GPTGSVKI-340

Mensch: 861-LPHPPGAP**LAMP**CRTIVPNA-880
 Maus: 860-LPHPPGTP**LAVP**CQTIVPNA-879
 Ratte: 860-LPHPPGAP**LAVP**CQTIVPNA-879

Mensch: 1856-ETPSRVGMKV**PTISV**TSFHS-1875
 Maus: 1801-ETPSRAGVKV**PTISIT**SFHS-1820
 Ratte: 1805-ETPSRAGVKV**PTISIT**SFHS-1824

Mensch: 2198-PGAAPT**LSVPT**DPPESEKPD-2217
 Maus: 2130-PGATPAL**PVPI**DPPESEKPD-2149
 Ratte: 2044-PGVTPAL**PVPT**DPPESEKPD-2063

Abbildung 7: Überprüfung der WNK2-Aminosäuresequenz auf Calcineurin-Bindungsmotive

N- und C-terminale WNK2-Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte beinhalten die mutmaßlichen Calcineurin-Bindungsmotive PxIxIT und LxVP (fett gedruckt); aufgrund der großen Übereinstimmung mit PxIxIT sowie der Konservierung zwischen den verschiedenen Spezies wurde DxIxIT ebenfalls als Calcineurin-Bindungsmotiv angenommen.

Darüber hinaus sind SPAK, KCC2 und NKCC1 bekannte Substrate von WNK2 (87), was die Formation eines multimolekularen Komplexes mit WNK2 als zentralem Gerüstprotein analog zu WNK1 ermöglichen könnte. Sollte ein solcher Komplex gebildet werden, müssten die interagierenden Proteine in Strukturen des ZNS kolokalisiert vorliegen, was mittels Immunhistochemie überprüft wurde.

3.2.2 Konfokalmikroskopische Lokalisation von KCC2, NKCC1, CnA β und pSPAK

Immunhistochemische Färbungen von KCC2 und NKCC1 auf Paraffinschnitten des Gehirns der adulten Wistar-Ratte ergaben ein unterschiedliches Verteilungsmuster der beiden Transporter. Während KCC2 primär in der Zellmembran kortikaler Pyramidenzellen lokalisiert war, zeigte sich das stärkste NKCC1-Signal in der *Lamina choroidea* des Plexus choroideus (s. Abbildung 8). Dies bestätigte die Ergebnisse vorausgegangener Studien: Postnatal wird die KCC2-Expression in kortikalen Neuronen gesteigert, während die NKCC1-Expression reduziert wird (60). In der apikalen Membran des Plexus choroideus trägt NKCC1 dagegen zur Liquorsekretion bei (73).

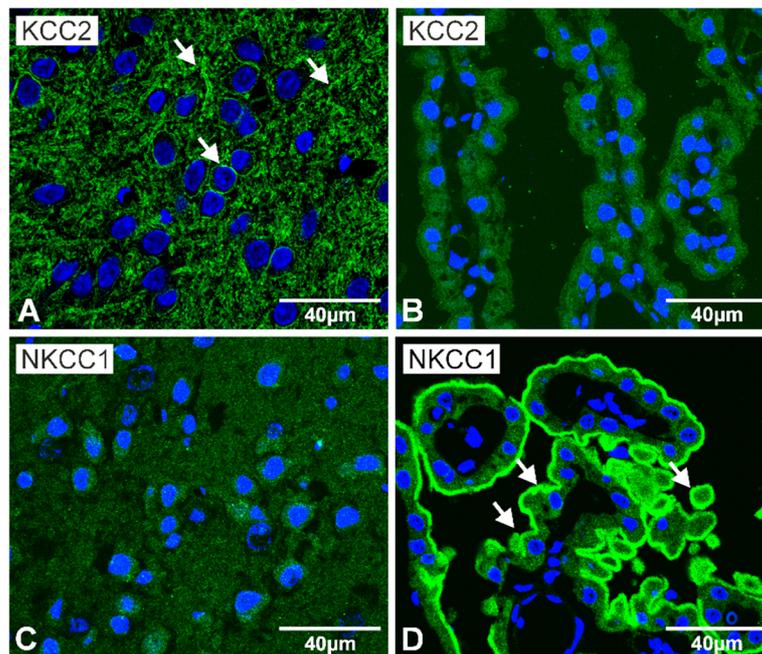


Abbildung 8: Lokalisation von KCC2 und NKCC1 im Cortex und Plexus choroideus

(A, B) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen aus dem adulten Gehirn der Wistar-Ratte ($n = 3$) zeigen ein starkes KCC2-Signal in der Zellmembran kortikaler Schicht IV und V Neuronen (A; weiße Pfeile). Im Plexus choroideus (B) zeigt sich keine eindeutige Färbung. (C, D) In der NKCC1-Markierung zeigt sich eine andere Verteilung: Kein signifikantes Signal in kortikalen Neuronen, dafür eine deutlich sichtbare Anreicherung in der apikalen Membran von Ependymzellen der *Lamina choroidea* (D; weiße Pfeile). (A-D) Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

Immunhistochemische Doppelmarkierungen von CnA β mit KCC2, NKCC1 und der aktivierten Form von SPAK/OSR1 (pS383-SPAK/pS325-OSR1) wurden auf Hirnschnitten adulter C57BL/6-Mäuse angefertigt (s. Abbildung 9), da die eingesetzten Antikörper gegen CnA β und pS383-SPAK im Mausgewebe eine deutlich bessere Immunreaktivität aufweisen als im Rattengewebe. CnA β zeigte sich hierbei in kortikalen Pyramidenzellen mit KCC2 und pS383-SPAK/pS325-OSR1 sowie im Plexus choroideus mit NKCC1 und pS383-SPAK/pS325-OSR1 kolokalisiert.

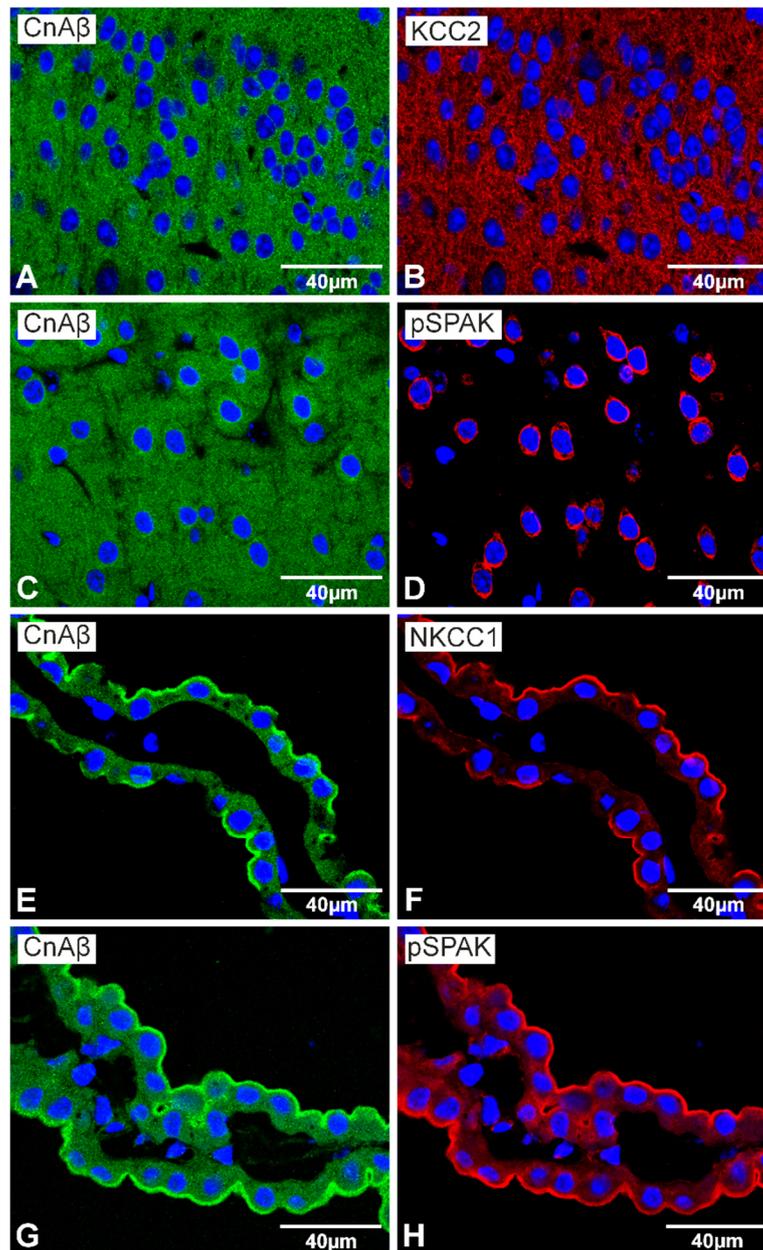


Abbildung 9: Kolokalisation von CnA β , KCC2, NKCC1 und pSPAK

(A-D) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen aus dem adulten Gehirn der C57BL/6-Maus ($n = 3$) zeigen Doppelmarkierungen von CnA β und KCC2 (A, B) sowie CnA β und pS383-SPAK (C, D) in kortikalen Schicht IV und V Neuronen. Die drei markierten Proteine zeigen sich kolokalisiert mit einem vorwiegend perinukleären, somatischen Signal. (E-H) Doppelmarkierungen von CnA β und NKCC1 (E, F) sowie CnA β und pS383-SPAK (G, H) im Plexus choroideus zeigen eine Kolokalisation der markierten Proteine in der *Lamina choroidea*. (A-H) Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

3.2.3 WNK2, KCC2 und NKCC1 bilden multiple Protein-Protein-Interaktionen mit CnA β und SPAK aus

Physische Interaktionen von KCC2, NKCC1, CnA β , SPAK, OSR1 und WNK2 wurden mittels Co-Immunpräzipitation untersucht. Hierzu wurden Primärantikörper gegen WNK2, KCC2 und NKCC1 an *Beads* immobilisiert und mit Hirnlysaten der Wistar-Ratte inkubiert. Proteine, die mit den Primärantikörper-gebundenen Proteinen interagieren, können anschließend mittels Western Blot der Eluate nachgewiesen werden. Unspezifische IgGs fungierten als Negativ-, Western Blots der nicht präzipitierten Hirnlysate als Positivkontrolle. Konkret konnten durch diesen Versuch multiple Interaktionen von WNK2, KCC2 und NKCC1 mit SPAK und CnA β detektiert werden (s. Abbildung 10), was die Formation eines multimolekularen Komplexes um WNK2 suggerierte (s. Abbildung 11). OSR1 interagierte nicht mit WNK2, KCC2 oder NKCC1, was auf die Rolle von SPAK als Vermittler der CNI-induzierten Neurotoxizität hinwies.

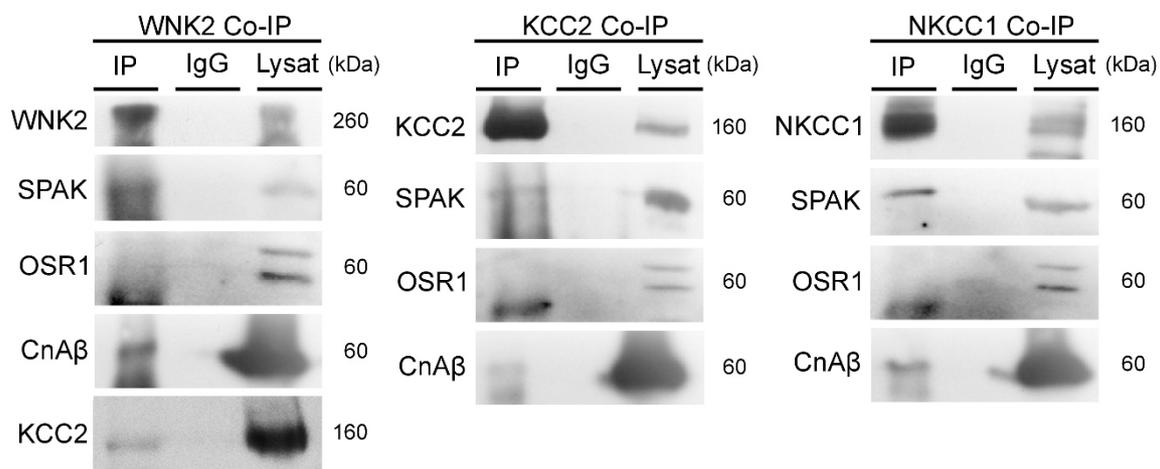


Abbildung 10: Co-Immunpräzipitation von WNK2, KCC2, und NKCC1

WNK2-, KCC2- oder NKCC1-antikörpergekoppelte *Beads* wurden mit Hirnlysaten der Wistar-Ratte immunpräzipitiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots der erhaltenen Eluate unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen WNK2, KCC2, NKCC1, SPAK, OSR1 und CnA β zur Detektion von Co-IP-Produkten. CnA β und SPAK wurden als immunpräzipitierende Proteine von WNK2, KCC2 und NKCC1 detektiert, nicht jedoch OSR1. KCC2 konnte als Co-IP-Produkt von WNK2 nachgewiesen werden. Unspezifische IgG wurden als Negativkontrolle verwendet, parallel durchgeführte Western Blots der Hirnlysate ohne IP fungierten als Positivkontrolle. Das Molekulargewicht der Proteine ist auf der rechten Seite angegeben; n = 4 unabhängige Experimente.

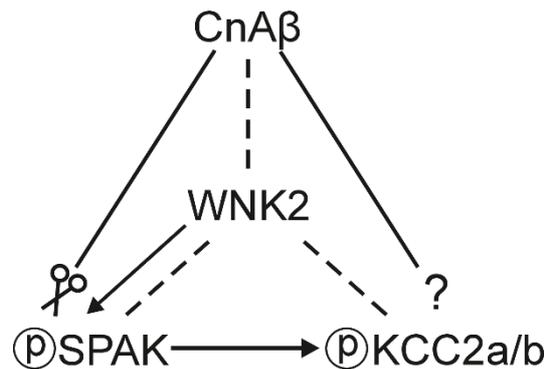


Abbildung 11: Schema der abgeleiteten Interaktionen von WNK2, CnA β , SPAK und KCC2a/b

Basierend auf den Ergebnissen der Co-IP ergeben sich physische (gestrichelte Linien) und funktionelle Interaktionen (durchgezogene Linien) zwischen WNK2, CnA β , SPAK und den beiden Isoformen KCC2a und KCC2b. Mit WNK2 als zentralem Gerüstprotein kann sowohl die Dephosphorylierung von SPAK durch CnA β als auch die Phosphorylierung von KCC2a/b durch SPAK ungeachtet des Fehlens von SPAK-Bindungsmotiven in KCC2b ermöglicht werden. Der Effekt der Interaktion von KCC2 und CnA β ist bisher nicht beschrieben. Möglicherweise kann CnA β die KCC2-Dephosphorylierung vermitteln.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass WNK2 als molekulares *Scaffold* potenziell die Interaktionen zwischen CnA β , SPAK und neuronalen CCCs vermitteln kann, auch wenn diese teilweise keine passenden Calcineurin- oder SPAK-Bindungsmotive aufweisen. Im nächsten Schritt galt es, molekularbiologische Effekte der Calcineurin-Inhibition auf neuronale CCCs unter verschiedenen Bedingungen abzubilden, um mögliche Ursachen der Entstehung erhöhter neuronaler [Cl⁻]_i unter CsA-Applikation zu definieren.

3.3 Akute Effekte der CsA-Behandlung *in vivo*

3.3.1 CsA-Kurzzeitbehandlung erhöht SPAK/OSR1- und KCC2-Phosphorylierung

Am Bedeutsamsten für die Cl⁻-Extrusion in kortikalen Neuronen ist der KCC2-Transporter, dessen Transportaktivität durch Phosphorylierung regulatorischer Serine, Threonine und Tyrosine gesteuert wird (s. Abbildung 3). Um kurzzeitige CsA-induzierte Effekte auf KCC2 *in vivo* abbilden zu können, wurden Wistar-Ratten mit i.p. Injektion von Vehikel (Cremophor, 1 h) oder CsA (25 mg/kg KG, 1 h) behandelt und Hirnlysate molekularbiologisch analysiert. Darüber hinaus erbrachten Western Blot-Analysen der SPAK/OSR1- und KCC2-Phosphorylierung den Nachweis weiterer induzierter Veränderungen durch einstündige CsA-Applikation (s. Abbildung 12). Bei konstanter SPAK- und KCC2-Abundanz waren im Vergleich zur Vehikel-Gruppe die aktivierende S383/S325-SPAK/OSR1-Phosphorylierung (+47 %) und die inhibitorische, SPAK-abhängige T1007-KCC2-Phosphorylierung (+78 %) signifikant gesteigert. Die aktivierende S940-KCC2-

Phosphorylierung zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen nach einstündiger CsA-Behandlung.

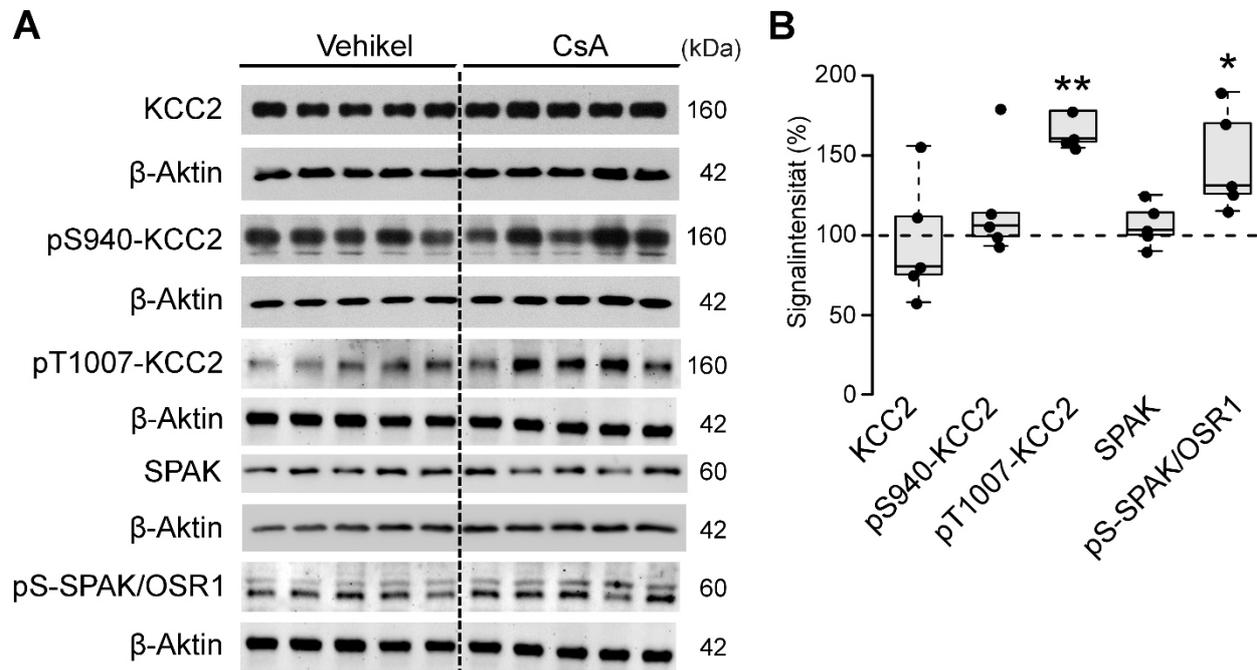


Abbildung 12: Effekte der CsA-Kurzzeitbehandlung auf die Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und SPAK/OSR1

(A) Postnukleäre Hirnlysate der 1h mit Vehikel oder CsA behandelten Wistar-Ratte (25 mg/kg KG CsA, n = 5 pro Gruppe) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und SPAK/OSR1 analysiert. Im Vergleich zur Vehikelgruppe zeigten sich nach CsA-Gabe die SPAK- und KCC2-Abundanz sowie die S940-KCC2-Phosphorylierung nicht signifikant verändert. Dagegen waren die aktivierende S383/S325-SPAK-OSR1-Stelle sowie die inhibitorische pT1007-KCC2-Stelle vermehrt phosphoryliert. Als Beladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet (pT1007-KCC2 und pS-SPAK/OSR1 liefen auf dem gleichen Gel und wurden auf dieselben β-Aktin-Banden normalisiert). Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite der Blots vermerkt. (B) Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. Vehikel-Intensitäten wurden auf 100% normalisiert. Box-Plots zeigen Median ± 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR × 1,5; * p < 0,05; ** p < 0,01; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

3.3.2 CsA-Kurzzeitbehandlung erhöht KCC2-Tyrosinphosphorylierung

Da Antikörper gegen die phosphorylierten Tyrosine Y903 und Y1087 im KCC2 C-Terminus weder kommerziell noch über eine Kollaboration verfügbar waren, wurde die KCC2-Tyrosinphosphorylierung mittels Co-IP evaluiert. Dafür wurden KCC2-Antikörper zunächst an *Beads* immobilisiert und mit Hirnlysaten von Vehikel- oder CsA-behandelten Ratten inkubiert. Im zweiten Schritt wurde ein Western Blot mit Eluaten der IP durchgeführt, wobei ein Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (pY) sowie ein Antikörper gegen KCC2 zur Detektion

immunreaktiver Signale eingesetzt wurden (s. Abbildung 13). Durch spezifische Bindung von KCC2 an die *Beads* erlaubt diese Methode, Rückschlüsse über die KCC2-Tyrosinphosphorylierung zu ziehen, indem das pY-Signal auf Höhe des detektierten KCC2-Signals (ca. 160 kDa) ausgewertet wird. In einem regulären Western Blot ohne vorherige Co-IP von KCC2 hätte der pY-Antikörper kein spezifisches Signal generieren können, da in den Lysaten unzählige phosphorylierte Proteine detektiert worden wären. Als Negativkontrolle wurden Eluate vor dem Western Blot mit unspezifischen IgG gleichen Isotyps inkubiert, Western Blots der nicht immunpräzipitierten Hirnlysate fungierten als Positivkontrolle. Im Vergleich zur Behandlung mit Vehikel resultierte die CsA-Behandlung in einer Steigerung des densitometrisch ermittelten pY:KCC2-Signalverhältnisses von 172%, was eine stark erhöhte, vermutlich inhibitorische KCC2-Tyrosinphosphorylierung suggerierte.

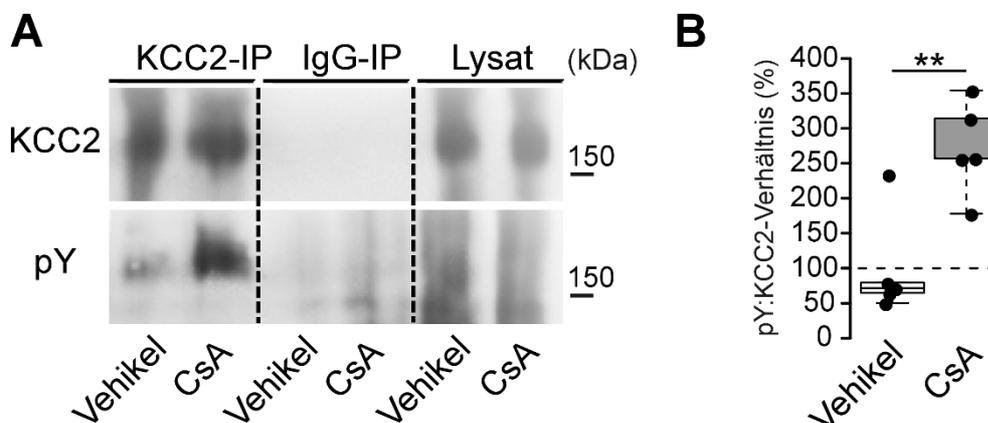


Abbildung 13: Effekte der CsA-Kurzzeitbehandlung auf die KCC2-Tyrosinphosphorylierung

(A) Repräsentative Western Blots von Eluaten nach Co-IP von KCC2 aus Hirnlysaten der mit Vehikel (Cremophor) oder CsA (25 mg/kg KG, 1 h) behandelten Wistar-Ratte ($n = 5$ pro Gruppe). Immunreaktive Signale wurden mit spezifischen Antikörpern gegen KCC2 oder phosphoryliertes Tyrosin (pY) generiert und auf Höhe von 160 kDa detektiert. Unspezifische IgG wurden als Negativkontrolle verwendet, nicht immunpräzipitierte Hirnlysate fungierten als Positivkontrolle. (B) Densitometrische Evaluation des pY:KCC2 Signalverhältnisses. CsA-Behandlung erhöht pY:KCC2-Signalverhältnis (+172% vs. Vehikel); Box-Plots zeigen Median \pm 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR \times 1,5. ** $p < 0,01$; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

Es lässt sich also bereits nach kurzer Zeit ein Effekt von CsA auf die SPAK/OSR1-Phosphorylierung sowie die KCC2-Tyrosin- und T1007-Phosphorylierung nachweisen, während Abundanz und S940-Phosphorylierung des Transporters unverändert sind. Insgesamt sind diese posttranslationalen Modifikationen vereinbar mit einer Beeinträchtigung der neuronalen Cl⁻-Extrusion aufgrund einer verminderten KCC2-Aktivität. Als Ursache kommt hierfür die SPAK/OSR1-Aktivierung durch verminderte Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung von pS383/S325-SPAK/OSR1 in Frage. Darüber hinaus kann die gesteigerte KCC2-

Tyrosinphosphorylierung sowohl durch vermehrte Aktivität von Tyrosinkinase als auch durch verminderte Aktivität von Tyrosinphosphatasen bedingt sein, was in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

3.4 Chronische Effekte der CsA-Behandlung *in vivo*

Die langfristige Wirkung der Calcineurin-Inhibition könnte sich von der kurzzeitigen unterscheiden, da Calcineurin nicht nur die Phosphorylierung seiner Substrate, sondern auch die Expression NFAT-abhängiger Gene reguliert. Darüber hinaus ist der klinische Manifestationszeitpunkt von CNI-induzierten neurologischen UAW inhomogen. Symptome können sich sowohl in der frühen postoperativen Phase nach Organtransplantation als auch Monate nach Therapieinduktion entwickeln (7), was als Hinweis auf potenzielle Unterschiede in der Pathophysiologie angesehen werden kann. Um also das gesamte Spektrum langfristiger CsA-Effekte auf Expression, Abundanz und Phosphorylierung von KCC2, NKCC1 und ihren regulierenden Kinasen SPAK/OSR1 sowie WNK2 abzubilden, wurden Wistar-Ratten für 14 Tage mit täglicher i.p. Injektion von Vehikel (Cremophor) oder CsA (25 mg/kg KG) behandelt und mittels qPCR, Western Blot und Immunhistochemie untersucht.

3.4.1 CsA-Langzeitbehandlung stimuliert die SPAK-Expression

In der qPCR (s. Abbildung 14) mit isolierter RNA aus Hirngewebe zeigte sich ein CsA-induzierter Anstieg der SPAK-Expression von 72% im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression konnten für WNK2, OSR1, NKCC1, Gesamt-KCC2 und die beiden KCC2-Spleißvarianten KCC2a und KCC2b nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse suggerieren eine gesteigerte SPAK-Expression infolge chronischer CsA-Behandlung. Ob dies auch zu einer tatsächlichen Steigerung der SPAK-Abundanz führt und ob es weitere Auswirkungen auf Abundanz und Phosphorylierung der untersuchten Transporter und Kinasen gibt, wurde mittels Western Blot überprüft.

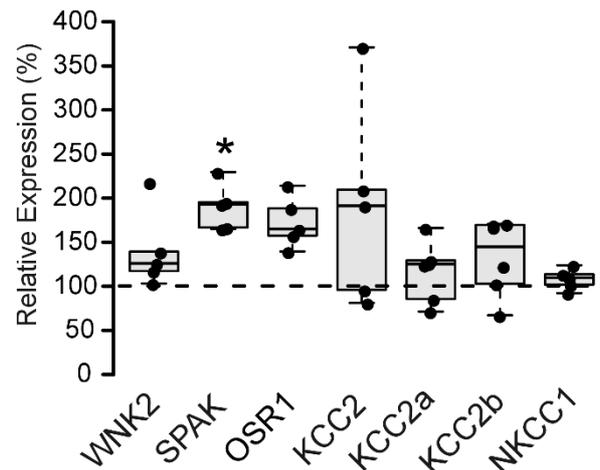


Abbildung 14: Effekte der CsA-Langzeitbehandlung auf die mRNA-Expression von WNK2, SPAK/OSR1, Gesamt-KCC2, KCC2a/b und NKCC1

Evaluation der qPCR-Versuche mit isolierter RNA aus Hirngewebe der Wistar-Ratte nach 14-tägiger Vehikel- oder CsA-Behandlung (n = 5 je Gruppe). Ermittelte ΔC_t -Werte wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert. Es ergibt sich ein signifikanter Anstieg der SPAK-Expression (+72% vs. Veh) bei unveränderter Expression von WNK2, Gesamt-KCC2, KCC2a/b, NKCC1 sowie OSR1 nach CsA-Stimulation im Vergleich zur Vehikelgruppe. Box-Plots zeigen Median \pm 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR \times 1,5. * $p < 0,05$; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

3.4.2 CsA-Langzeitbehandlung inhibiert KCC2 und aktiviert NKCC1

Im Western Blot von Hirnlysaten der langfristig mit CsA oder Vehikel behandelten Wistar-Ratten (s. Abbildung 15) zeigte sich trotz vermehrter mRNA-Expression keine gesteigerte SPAK-Abundanz nach CsA-Behandlung. Ebenso war die Abundanz von KCC2 und WNK2 unverändert, die NKCC1-Proteinexpression jedoch im Vergleich zur Vehikelgruppe um 104% gesteigert. Auf posttranslatonaler Ebene induzierte die chronische Calcineurin-Inhibition multiple Modifikationen. In CsA-behandelten Ratten war die aktivierende SPAK/OSR1-Phosphorylierung (pS383/pS325) um 75% gesteigert. Ebenso waren die WNK1- und SPAK-abhängigen inhibitorischen Threonine von KCC2 um 81% (pT906) bzw. 84% (pT1007) vermehrt phosphoryliert. Die PKC-abhängige aktivierende KCC2-Serinphosphorylierung (pS940) wurde durch chronische CsA-Applikation im Gegensatz zur Kurzzeitbehandlung auf 39% des Vehikelniveaus supprimiert. Keine Veränderung zeigte sich in der NKCC1-Phosphorylierung (pT212/217).

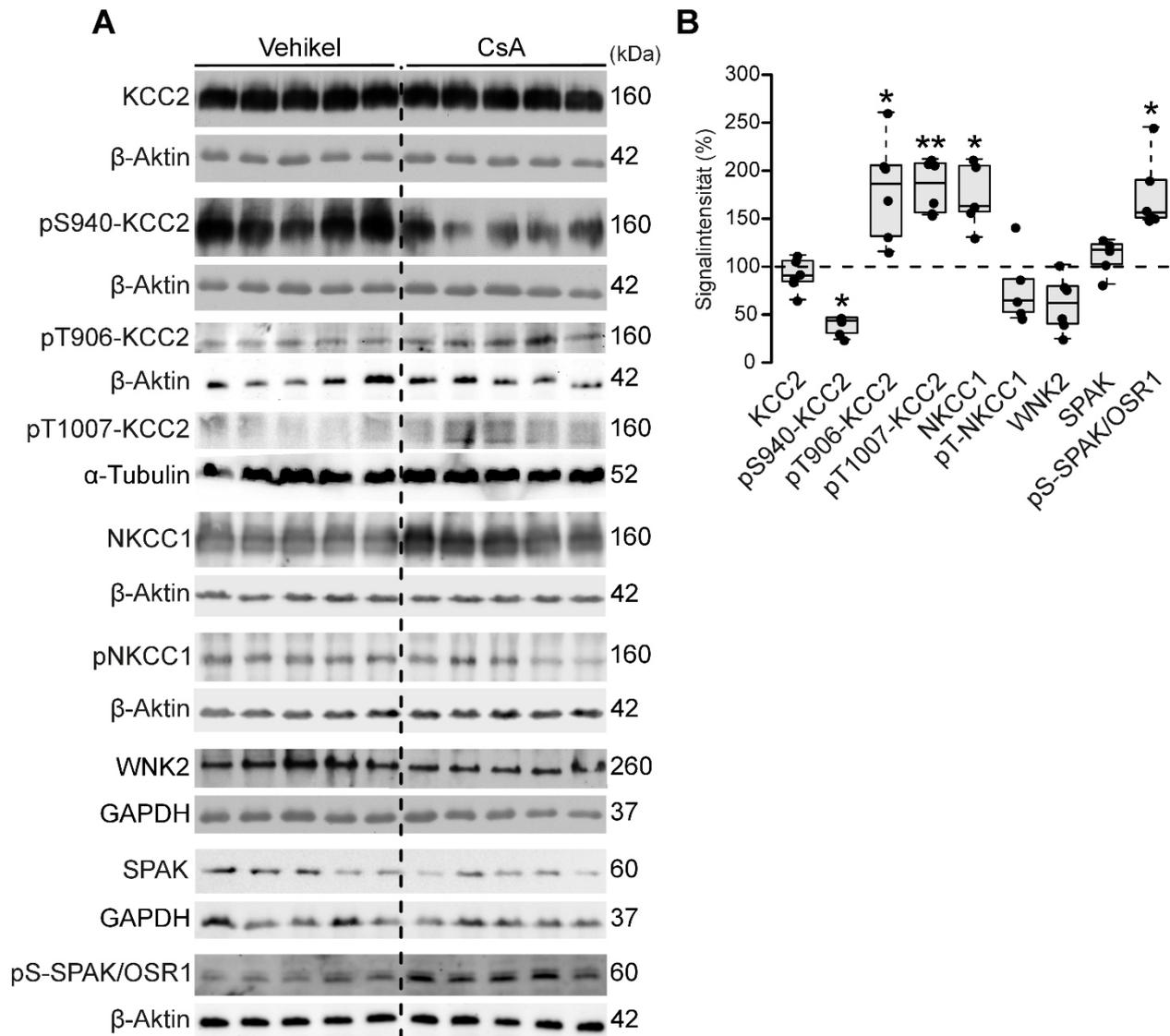


Abbildung 15: Effekte der CsA-Langzeitbehandlung auf die Abundanz und Phosphorylierung von WNK2, SPAK/OSR1, KCC2 und NKCC1

(A) Postnukleäre Hirnlysate der Wistar-Ratte nach 14-tägiger CsA- oder Vehikelbehandlung wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz und Phosphorylierung von KCC2, NKCC1, WNK2 und SPAK/OSR1 analysiert. KCC2 zeigte sich nach CsA-Behandlung bei nicht signifikant veränderter Abundanz vermehrt phosphoryliert an T906 (+81% vs. Veh) sowie T1007 (+84% vs. Veh) und vermindert phosphoryliert an S940 (-61% vs. Veh). Die NKCC1-Abundanz war signifikant gesteigert (+104% vs. Veh), die T212/217-Phosphorylierung jedoch unverändert. Bei nicht signifikant veränderter SPAK-Abundanz war die SPAK/OSR1-S383/S325-Phosphorylierung gesteigert (+75% für pS383/S325-SPAK/OSR1 vs. Veh). Als Beladungskontrolle wurden β-Aktin, α-Tubulin oder GAPDH verwendet. Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite der Blots vermerkt. (B) Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. Vehikel-Intensitäten wurden auf 100% normalisiert. Box-Plots zeigen Median ± 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR × 1,5. * p < 0,05; ** p < 0,01; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

Sowohl die gesteigerte Phosphorylierung von T906/T1007-KCC2 als auch die verminderte S940-KCC2-Phosphorylierung suggerieren eine Inhibition der neuronalen Cl⁻-Extrusion durch chronische CsA-Applikation. Additive Effekte könnten durch vermehrten Cl⁻-Import aufgrund der gesteigerten NKCC1-Abundanz vermittelt werden, obwohl die aktivierende T212/T217-NKCC1-Phosphorylierung nicht gesteigert war.

Da die verabreichte CsA-Dosis (25 mg/kg KG) im suprathérapeutischen Bereich lag, wurden zusätzlich vier Ratten für 14 d täglich mit der therapeutischen Induktionsdosis (5 mg/kg KG i.p.) behandelt. Exemplarisch sollte so getestet werden, ob auch eine therapeutische CsA-Dosierung suffizient ist, um Veränderungen der KCC2-Phosphorylierung zu induzieren. Als Parameter hierfür wurde die Fluoreszenzintensität des pS940-KCC2-Signals in der Zellmembran kortikaler Pyramidenzellen mittels Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie bestimmt (s. Abbildung 16).

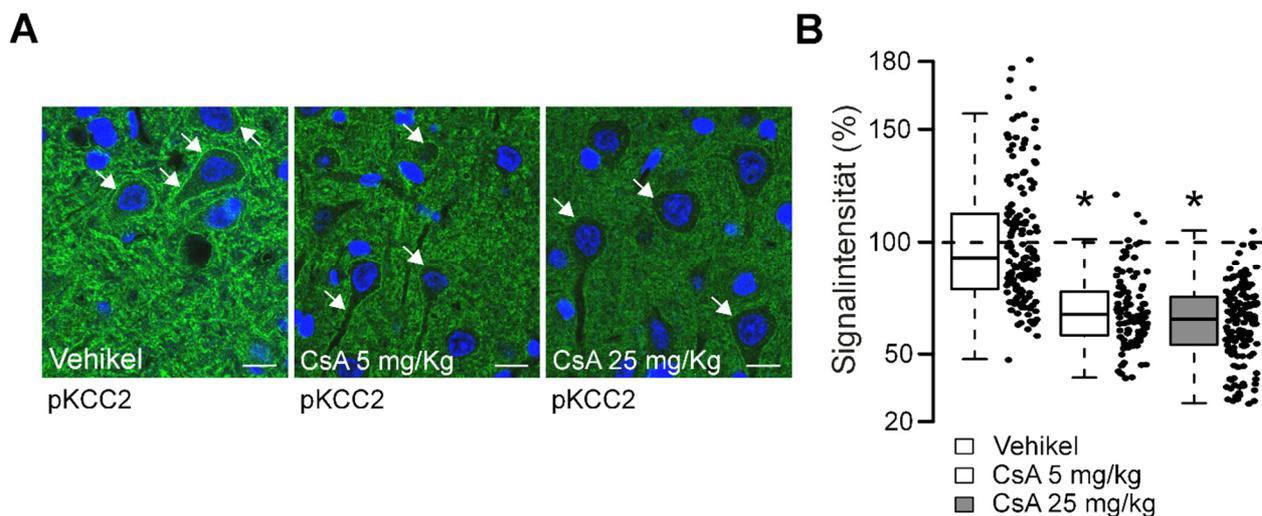


Abbildung 16: Fluoreszenzintensität von pS940-KCC2 in Schicht V Cortexneuronen der Wistar-Ratte nach 14-tägiger Vehikel- oder CsA-Behandlung

(A) Repräsentative immunhistochemische Markierung von pS940-KCC2 (grün) auf Paraffinschnitten des Gehirns von 14 d mit Vehikel (Cremophor) oder CsA (5 oder 25 mg/kg) behandelten Wistar-Ratten (n = 4 pro Gruppe). Konfokalmikroskopisch zeigt sich eine Abnahme der S940-Phosphorylierung des KCC2-Transporters in der Zellmembran kortikaler Schicht V Pyramidenzellen (Pfeile) in Abhängigkeit der applizierten CsA-Dosis. Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 10 µm. (B) Quantifizierung der pS940-KCC2 Signalintensität in der neuronalen Zellmembran mittels ImageJ Software. Datenpunkte wurden auf den Mittelwert der Vehikel-Signalintensität normalisiert. Box-Plots zeigen Median ± 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR × 1,5. * p < 0,05 im Vergleich zur Vehikelbehandlung; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

Beide CsA-Dosierungen reduzierten im Vergleich zur Vehikelbehandlung die Signalintensität von pS940-KCC2 in der neuronalen Zellmembran (-31% für 5 mg/kg KG CsA und -35% für

25 mg/kg KG CsA). Somit wurde prinzipiell demonstriert, dass die chronische CsA-Applikation auch im therapeutischen Bereich posttranslationale Modifikationen von KCC2 induzieren kann.

3.5 Rekapitulation der Maximaleffekte der Calcineurin- und SPAK-Inhibition mithilfe von globalen Knockout-Modellen

Aus den molekularbiologischen Ergebnissen der Kurz- und Langzeitbehandlung mit CsA konnten Hypothesen für weiterführende Experimente generiert werden. Wenn die CsA-induzierte Erhöhung der neuronalen $[Cl^-]_i$ durch eine SPAK-Aktivierung mit konsekutiver KCC2-Inhibition und NKCC1-Stimulation bedingt ist, sollten die beobachteten posttranslationalen Modifikationen durch genetische Calcineurin-Depletion reproduzierbar und durch SPAK-Depletion umkehrbar sein. Vorausgegangene Studien zur renalen Calcineurin-abhängigen Regulation des WNK-SPAK-CCC-Signalweges identifizierten die CnA β -Isoform bereits als SPAK-Inhibitor in der Niere (21, 28). Um zu prüfen, ob ein analoger Effekt im ZNS existiert, wurden für die nachfolgenden Experimente CnA $\beta^{-/-}$ Mäuse verwendet, die über eine funktionierende CnA α -Isoform verfügen.

3.5.1 CnA β -Knockout reproduziert Effekte der chronischen CsA-Behandlung

Vor der experimentellen Evaluation des CnA β -defizienten Mausmodells wurde zunächst eine Bestätigung des Knockouts durchgeführt. Hierzu wurden Hirnlysate der CnA $\beta^{-/-}$ Maus und von entsprechenden WT-Kontrollen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (s. Abbildung 17). Hierbei konnte die Abwesenheit von CnA β in Lysaten der CnA $\beta^{-/-}$ Mäuse anhand des Fehlens des spezifischen Signals auf Höhe von 60 kDa verifiziert werden. Positivkontrollen mit WT Hirnlysaten lieferte ein starkes CnA β -Signal und bestätigte somit die Spezifität des Antikörpers.

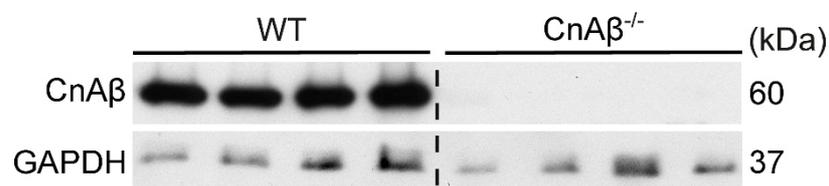


Abbildung 17: Verifikation des CnA β -Knockouts mittels Western Blot

Postnukleäre Hirnlysate von WT und CnA β -defizienten C57BL/6-Mäusen (n = 4 pro Gruppe) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz von CnA β analysiert. Im Gegensatz zum WT lässt sich in CnA β -defizienten Mäusen nach Markierung mit CnA β -Antikörper keine Bande auf Höhe von 60 kDa erkennen. GAPDH konnte in jeder Lane detektiert werden, womit der CnA β -Knockout experimentell verifiziert wurde.

Im Western Blot von Hirnlysaten der $\text{CnA}\beta^{-/-}$ Maus und entsprechenden WT-Kontrollen ließen sich die Ergebnisse aus dem chronischen CsA-Behandlungsversuch weitestgehend reproduzieren (s. Abbildung 18).

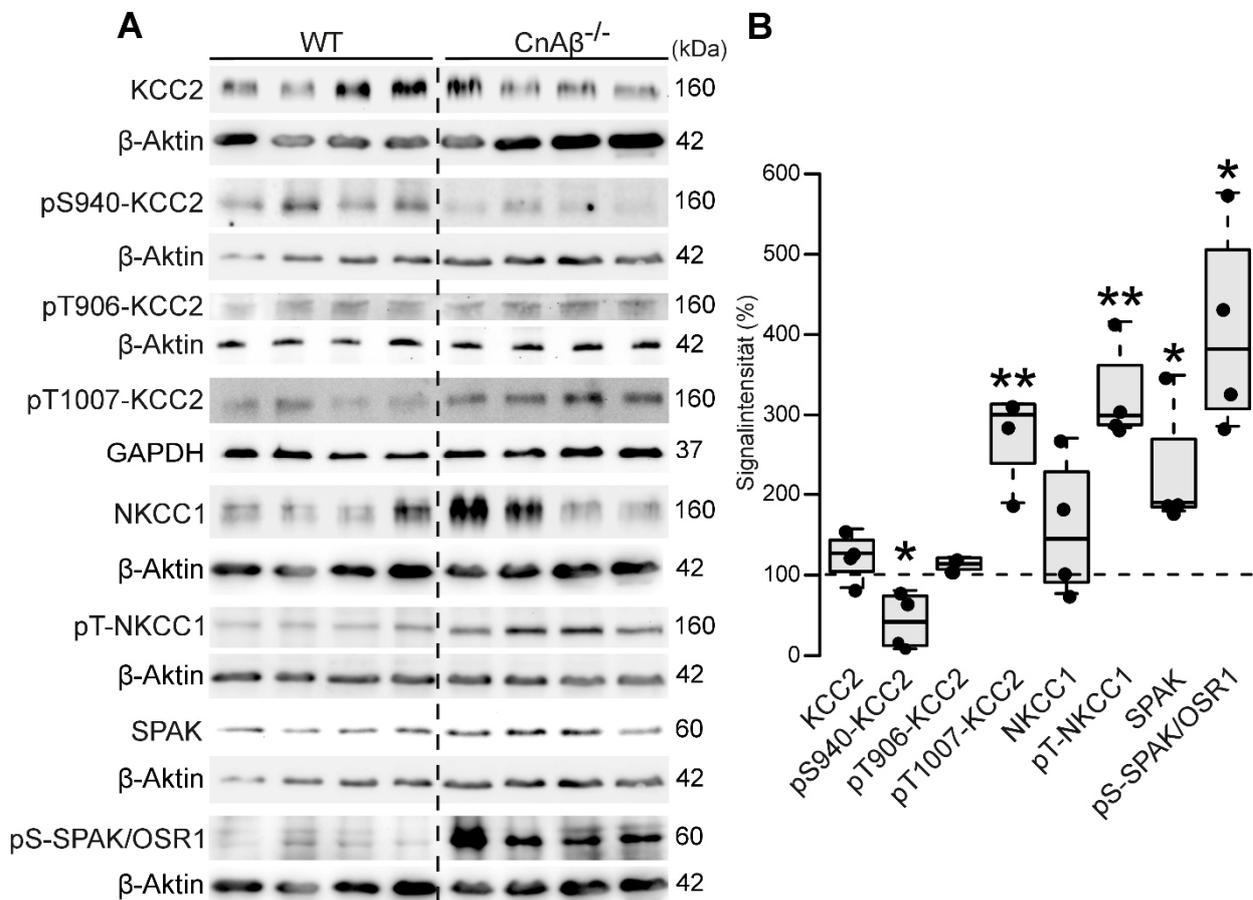


Abbildung 18: Effekte des $\text{CnA}\beta$ -Knockouts auf Abundanz und Phosphorylierung von KCC2, NKCC1 und SPAK/OSR1

(A) Postnukleäre Hirnlysate von WT und $\text{CnA}\beta$ -defizienten C57BL/6-Mäusen ($n = 4$ pro Gruppe) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz und Phosphorylierung von KCC2, NKCC1 und SPAK/OSR1 analysiert. KCC2 zeigte sich im Knockout bei nicht signifikant veränderter Abundanz vermehrt phosphoryliert an T1007 (+176% vs. WT), vermindert phosphoryliert an S940 (-67% vs. WT) und nicht verändert an T906. Die NKCC1-Abundanz war ebenfalls nicht signifikant verschieden, die T212/217-Phosphorylierung im Knockout jedoch gesteigert (+225% vs. WT). SPAK/OSR1-Abundanz und S383/S325-Phosphorylierung zeigten sich im Knockout beide gesteigert (+127% für SPAK/OSR1 und +306% für pS383/S325-SPAK/OSR1 jeweils vs. WT). Als Beladungskontrolle wurden β -Aktin oder GAPDH verwendet. Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite der Blots vermerkt. (B) Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. WT-Signale wurden auf 100% normalisiert. Box-Plots zeigen Median \pm 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR \times 1,5. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

Der $\text{CnA}\beta$ -Knockout induzierte eine Erhöhung der SPAK-Abundanz (+127%) in Kombination mit einer stark erhöhten aktivierenden SPAK/OSR1-Phosphorylierung (pS383/S325, +306%).

Auch KCC2 und NKCC1 wiesen bei unveränderter Abundanz multiple posttranslationale Modifikationen auf. Die SPAK-abhängige Phosphorylierung von NKCC1 (pT212/T217, aktivierend, +225%) und KCC2 (pT1007, inhibitorisch, +176%) war im CnA β -Knockout gesteigert, während die aktivierende, PKC-abhängige S940-KCC2-Stelle vermindert phosphoryliert war (-67%). Das WNK1-vermittelt phosphorylierte T906-KCC2 zeigte sich im CnA β -Knockout, anders als im chronischen CsA-Versuch, nicht vermehrt phosphoryliert. Eine potenzielle Regulation durch das vom Knockout nicht erfasste, aber durch CsA inhibierte CnA α erscheint somit denkbar. Insgesamt suggerieren diese Ergebnisse eine regulatorische Funktion von CnA β als Aktivator von KCC2 und Inhibitor von NKCC1. Dieser Effekt kann potenziell über Inaktivierung der SPAK-Kinase oder direkte Dephosphorylierung neuronaler CCCs vermittelt sein. Die postulierte Umkehrbarkeit der observierten posttranslationalen Modifikationen durch genetische SPAK-Depletion wurde im nächsten Schritt untersucht.

3.5.2 SPAK-Knockout aktiviert KCC2 und hemmt NKCC1

Analog zum CnA β -defizienten Mausmodell wurde zunächst eine experimentelle Verifikation des SPAK-Knockouts mittels Western Blot von Hirnlysaten angestrebt (s. Abbildung 19). In SPAK^{-/-}-Mäusen ließ sich im Vergleich zu WT-Mäusen keine der SPAK-Kinase entsprechende Bande auf Höhe von 60 kDa erkennen. Da die OSR1-Expression nicht durch den SPAK-Knockout beeinflusst wird und der eingesetzte Antikörper aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Kinasen auch OSR1 detektiert, konnte OSR1 direkt unterhalb der fehlenden SPAK-Bande nachgewiesen werden. Als Beladungskontrolle wurde β -Aktin in jeder Lane nachgewiesen.

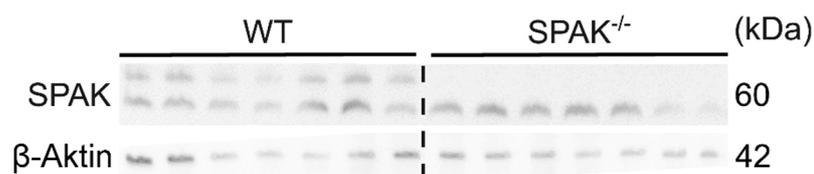


Abbildung 19: Verifikation des SPAK-Knockouts mittels Western Blot

Postnukleäre Hirnlysate von WT und SPAK-defizienten C57BL/6-Mäusen (n = 7 pro Gruppe) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz von SPAK analysiert. Im Gegensatz zum WT lässt sich in SPAK-defizienten Mäusen nach Markierung mit SPAK-Antikörper keine Bande auf Höhe von 60 kDa erkennen. Bei ca. 58 kDa findet sich jedoch sowohl in WT als auch in SPAK-KO Mäusen eine OSR1 entsprechende Bande, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie ebenfalls durch den SPAK-Antikörper erkannt wird. β -Aktin konnte als Beladungskontrolle in jeder Lane detektiert werden, womit der SPAK-Knockout experimentell verifiziert wurde.

Die bisherigen biochemischen Versuche unter pharmakologischer und genetischer Calcineurin-Inhibition legten eine Aktivierung der SPAK-Kinase und daraus resultierende Hemmung des

KCC2-Transporters auf posttranslationaler Ebene nahe. Inwiefern diese Effekte potenziell durch SPAK-Inhibition modifizierbar sind, wurde anhand eines SPAK-defizienten Mausmodells evaluiert (s. Abbildung 20). Im Western Blot war die SPAK-abhängige NKCC1- und KCC2-Phosphorylierung in SPAK-defizienten Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu WT-Mäusen (-45% für pT1007-KCC2, -54% für pT212/T217-NKCC1). Keine Veränderung zeigte sich bei der Gesamtabundanz von NKCC1 und KCC2 sowie den in der Literatur als nicht direkt SPAK-abhängig beschriebenen pT906- und pS940-KCC2-Phosphorylierungsstellen.

Diese Ergebnisse bestätigten, dass SPAK die pT1007-KCC2- sowie pT212/T217-NKCC1-Phosphorylierung vermittelt, aber KCC2 nicht an pT906 oder pS940 phosphoryliert (54, 94, 123). Des Weiteren stützten sie die Hypothese, dass die SPAK-Inhibition CsA-induzierte posttranslationale Modifikationen neuronaler CCCs prinzipiell antagonisieren könnte und somit einen potenziellen Ansatz für die Therapie der CNI-Neurotoxizität darstellt.

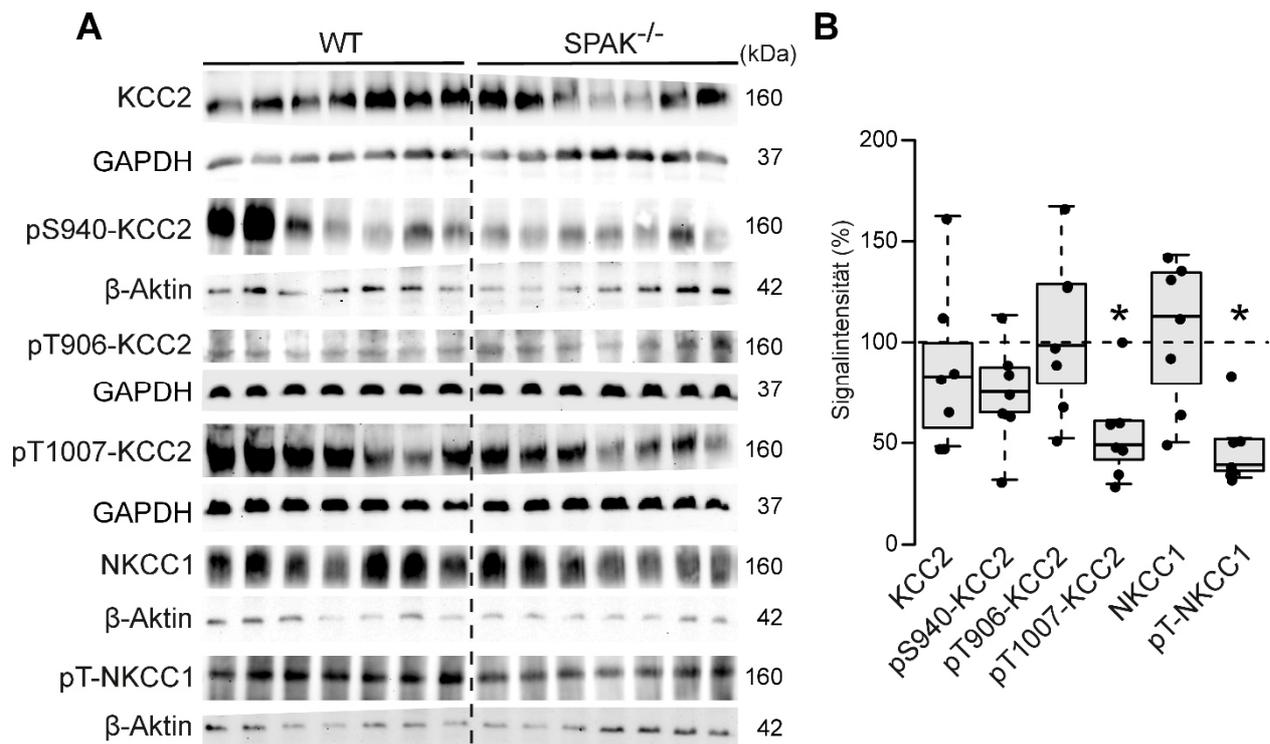


Abbildung 20: Effekte des SPAK-Knockouts auf Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und NKCC1

(A) Postnukleäre Hirnlysate von WT und SPAK-defizienten C57BL/6-Mäusen ($n = 7$ pro Gruppe) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot hinsichtlich der Abundanz und Phosphorylierung von KCC2 und NKCC1 analysiert. SPAK-abhängige KCC2- und NKCC1-Phosphorylierungsstellen zeigten sich im SPAK-Knockout vermindert phosphoryliert (-45% für pT1007-KCC2 und -54% für pT212/217-NKCC1, jeweils vs. WT) bei unveränderter Abundanz der Transporter. Die Phosphorylierung der SPAK-unabhängigen pT906-KCC2- und pS940-KCC2-Stelle zeigte sich im Vergleich zum WT nicht signifikant verändert. Als Beladungskontrolle wurden β -Aktin oder GAPDH verwendet. Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite der Blots vermerkt. (B) Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. WT-Signale wurden auf 100% normalisiert (gestrichelte Linie). Box-Plots zeigen Median \pm 25-75% IQR, Whisker entsprechen Quartil 1 oder 3 + IQR \times 1,5. * $p < 0,05$; zweiseitiger Zweistichproben-T-Test.

4 Diskussion

Das experimentelle Design der vorliegenden Arbeit stützte sich auf die Hypothese, dass die neurologischen Nebenwirkungen der Calcineurin-Inhibition partiell durch eine veränderte Phosphorylierung von KCC2 oder NKCC1 verursacht werden. Hierbei wurde das Konzept der CNI-vermittelten SPAK-Aktivierung auf die Regulation der beiden Transporter in Neuronen übertragen. Die Ergebnisse dieser Studie liefern neue Einblicke sowohl in die physiologische Regulation der neuronalen Cl⁻-Homöostase, als auch in die Pathogenese der CNI-abhängigen Neurotoxizität, welche große klinische Relevanz besitzt. Im Folgenden werden die Hauptaussagen dieser Arbeit diskutiert und Implikationen für eine potenzielle, zukünftige pharmakologische Therapie der CNI-induzierten Neurotoxizität erörtert.

4.1 Modulation der neuronalen Erregbarkeit durch Calcineurin-Inhibition

Auswirkungen der einstündigen CsA-Inkubation auf die neuronale Erregbarkeit kortikaler Schicht II/III Neurone der Wistar-Ratte wurden elektrophysiologisch mittels intrazellulärer Ableitungen untersucht. Als pathologisches Korrelat des vorbeschriebenen neuromodulatorischen Effekts von CsA (124) wurde eine verlängerte Cl⁻-Extrusionszeit nachgewiesen. Anhand von 2P-FLIM-Messungen wurde demonstriert, dass dies tatsächlich in einem Anstieg der [Cl⁻]_i auf etwa 13 mM in kortikalen Neuronen resultiert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Studien, die eine CsA-induzierte epileptiforme Aktivität *in vitro* beschreiben (125, 126) und kontribuieren potenziell zur Entstehung des klinischen Phänotyps der CNI-Neurotoxizität (7).

Allerdings existieren ebenfalls zahlreiche Arbeiten, die CNI eine neuroprotektive Wirkung zuschreiben. So führt die Gabe von CsA zu einer reduzierten Krampfanfallfrequenz und verbessertem Überleben in Ratten mit Pilocarpin- oder Kainat-induziertem Status epilepticus (127, 128). In Ischämie-/ Reperfusionstudien, bei denen ein ischämischer Schlaganfall durch zeitweilige Ligatur der *arteria carotis interna* induziert wird, führt die Präinkubation mit CsA zu einer Verkleinerung des resultierenden Infarktareals (129). Ebenso ist das Ausmaß des kortikalen Funktionsverlusts in experimentellen Modellen des traumatischen Hirnschadens kleiner, wenn mit dem Setzen der Läsion eine zeitgleiche CsA-Applikation erfolgt (130). Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich jedoch erklären, wenn man die experimentellen Konditionen näher betrachtet. Unter physiologischen Bedingungen induziert die Calcineurin-Inhibition neuronale Übererregbarkeit, was sich durch Modulation der CCC-Phosphorylierung mit Anstieg der [Cl⁻]_i erklären lässt. In den zuvor erwähnten Status epilepticus-Modellen induziert der starke Anstieg der [Ca²⁺]_i hingegen eine pathologisch hohe Calcineurin-Aktivität mit Implikationen für die

Funktion des GABA_A-Rezeptors (131). Eine überschießende Calcineurin-vermittelte GABA_A-Rezeptor-Dephosphorylierung führt zu verminderter GABAerger Transmission durch vermehrte laterale Diffusion und Inaktivierung des Rezeptors, wodurch die neuronale Erregbarkeit beträchtlich erhöht wird (131, 132). In diesem Fall kann die CNI-Applikation durch Restitution der GABA_A-Rezeptor-Phosphorylierung neuroprotektiv wirken (132).

Außerdem beeinflusst CsA über zwei weitere Mechanismen den mitochondrialen Energiestoffwechsel. Unter normoxischen Konditionen stört CsA die mitochondriale ATP-Synthese und führt zur sogenannten ischämischen Präkonditionierung der Zelle, die in der Folge durch verschiedene adaptive Mechanismen besser gegen Ischämie- und Reperfusionsschäden geschützt ist (133). Unter hypoxischen Bedingungen wirkt außerdem die CsA-vermittelte Inhibition von Cyclophilin D (CyPD) neuroprotektiv (134). Die CyPD-abhängige Öffnung der sogenannten mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP) in Gegenwart pathologisch hoher cytosolischer $[Ca^{2+}]$ führt zu einer Überladung des Mitochondriums mit Ca^{2+} und seinem irreversiblen Funktionsverlust (134). CsA-Applikation schließt die MPTP durch CyPD-Inhibition und reduziert die mitochondriale Dysfunktion unter Hypoxie, wodurch die ischämieinduzierte Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration deutlich geringer ausfällt (135).

Es lässt sich also zusammenfassen, dass der Netto-Effekt der Calcineurin-Inhibition durch die Versuchsbedingungen determiniert wird. Unter Konditionen mit pathologisch erhöhter Calcineurin-Aktivität kann die CNI-Applikation einerseits neuroprotektiv wirken, während sie unter physiologischen Bedingungen neurotoxisch durch intrazelluläre Cl⁻-Akkumulation wirkt. Die Ergebnisse dieser Dissertation stehen daher nicht im Widerspruch zu Studien, die CsA einen neuroprotektiven Nutzen zusprechen, sondern erweitern das Verständnis der vielfältigen Implikationen von Calcineurin für die Regulation neuronaler Erregbarkeit.

4.2 WNK2-*Scaffold*-vermittelte Interaktion von CCCs, CnAβ und SPAK

Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war der molekulare Mechanismus der Modulation der KCC2- oder NKCC1-Aktivität durch CNI. Da die beiden Transporter keine konservierten Calcineurin-Bindungsmotive besitzen, wurde die Möglichkeit einer Gerüstprotein (*Scaffold*)-vermittelten Interaktion von Calcineurin und CCCs evaluiert. Basierend auf publizierten Daten, dass WNK2 als *Scaffold* an der Vermittlung der SPAK-NKCC1-Interaktion beteiligt ist (87), wurde ein Screening der C- und N-terminalen AS-Sequenzen der WNK-Kinasen durchgeführt und WNK2 als einzige Kinase identifiziert, die über SPAK- und Calcineurin-Bindungsmotive verfügt. Die Immunpräzipitationsexperimente zeigten multiple Interaktionen zwischen WNK2, CnAβ,

SPAK und KCC2 bzw. NKCC1 und wiesen somit auf die Formierung eines multimolekularen Komplexes hin (s. Abbildung 10). Die Datenlage spricht dafür, dass WNK2 als wichtiges Gerüstprotein für diese Interaktion fungieren kann. Schwankungen der $[Cl^-]_i$ oder der Osmolarität könnten potenziell durch die räumliche Annäherung regulatorischer Kinasen und Phosphatasen an neuronale CCCs effektiver ausgeglichen werden. Es lässt sich außerdem spekulieren, dass die Existenz der Ca^{2+} -abhängigen Calcineurin-Phosphatase in diesem Komplex Wechselwirkungen von neuronaler Ca^{2+} - und Cl^- -Homöostase ermöglicht.

Für die Einordnung dieser Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kenntnisstand sind die Ergebnisse dreier Studien von grundlegender Bedeutung. Die SPAK-abhängige Phosphorylierung der KCC2a-Isoform wird direkt, d.h. ohne weitere zwischengeschaltete Kinasen, vermittelt (94). Die in adulten Neuronen prädominante KCC2b-Isoform besitzt aufgrund eines alternativen N-Terminus im Gegensatz zu KCC2a kein SPAK-Bindungsmotiv (52), wird aber dennoch SPAK-abhängig reguliert: In KCC2b-transfizierten HEK293-Zellen führt die kompetitive SPAK-Inhibition zu einer Steigerung der KCC2b-vermittelten Rubidium-Aufnahme (136). Neben WNK1 (s. unten) ist WNK2 prinzipiell als Gerüstprotein zur Vermittlung der SPAK-KCC2b-Interaktion kompatibel, da es in den Versuchen dieser Dissertationen mit beiden immunpräzipitierte. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion sollte in weiterführenden Experimenten, beispielsweise durch Bestimmung der SPAK-abhängigen KCC2b-Phosphorylierung unter *WNK2-Knockdown* in einer neuronalen Primärzellkultur, exploriert werden.

WNK1 wurde in vorherigen Studien ebenfalls als potenzieller Vermittler der SPAK/KCC2b-Interaktion in juvenilen, kultivierten Cortex- und Hippocampusneuronen evaluiert (123). Im Hippocampus wurde sogar explizit der Komplex aus WNK1, SPAK und KCC2 als maßgeblich für die Feinabstimmung der GABAergen Transmission beschrieben (137). Da hippocampale Neurone WNK2 im Gegensatz zu kortikalen und thalamischen Neuronen nur in vernachlässigbar geringer Abundanz exprimieren (87), ist es kaum verwunderlich, dass diese Studie keine *WNK2-Scaffold*-Funktion für die Vermittlung der SPAK-KCC2b-Interaktion nachweisen konnte. Basierend auf der Annahme, dass sowohl WNK1 als auch WNK2 die SPAK-abhängige KCC2b-Phosphorylierung begünstigen, lässt sich hypothetisieren, dass die distinkte WNK2-Expression funktionelle Implikationen für die KCC2-Phosphoregulation in verschiedenen neuronalen Zelltypen besitzt. In Neuronen, welche WNK1 und WNK2 co-exprimieren, könnte möglicherweise eine Konkurrenz zwischen beiden Kinasen um die Rolle des *Scaffolds* existieren. Da der WNK2-abhängig formierte Molekülkomplex neben einer Cl^- -sensitiven WNK-Kinase auch die Ca^{2+} -sensitive Calcineurin-Phosphatase beinhaltet, könnte die Cl^- -Homöostase in WNK2-positiven Neuronen in Abhängigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ reguliert werden, während bisher keine Interaktion

zwischen WNK1 und Calcineurin beschrieben wurde. Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit konsekutiver Calcineurin-Aktivierung würde in WNK2-positiven Zellen zu einer verstärkten Dephosphorylierung von SPAK und KCC2b führen und in vermehrter Cl^- -Extrusion resultieren. Dieser Mechanismus könnte den transmembranären Cl^- -Gradienten, ergo die treibende Kraft der GABAergen Inhibition, dynamisch an Schwankungen der $[Ca^{2+}]_i$ koppeln und dem Entstehen neuronaler Übererregbarkeit entgegenwirken. Möglicherweise manifestieren sich im Umkehrschluss pathologische Effekte der Calcineurin-Inhibition stärker in WNK2-exprimierenden Neuronen. Für die Bestätigung dieser Hypothesen sind weitere Experimente notwendig. So könnte die Bestimmung der SPAK- und KCC2-Phosphorylierung unter CsA-Applikation in primären Zellkulturen kortikaler und hippocampaler Neurone einen Hinweis auf Unterschiede der CNI-Wirkung in Neuronen mit hoher oder niedriger WNK2-Expression liefern. Zudem könnte ergänzend die CsA-abhängige Cl^- -Extrusionszeit in hippocampalen Neuronen bestimmt werden, um unterschiedlich starke Effekte auf die neuronale Cl^- -Homöostase im Vergleich zu den Versuchen dieser Dissertation nachzuweisen.

Zusammengefasst wurde WNK2 in dieser Dissertation als molekulares *Scaffold* identifiziert, welches potenziell sowohl die Interaktion von $CnA\beta$ mit SPAK und CCCs als auch die Interaktion von SPAK und der KCC2b-Isoform in kortikalen Neuronen vermitteln kann. Physiologisch könnte dieser Mechanismus Relevanz für die Regulation der neuronalen $[Cl^-]_i$ und Osmolarität besitzen und regulatorische Wechselwirkungen mit der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglichen. Ein ähnlicher multimolekularer Komplex existiert in WNK1 exprimierenden Neuronen vermutlich ohne Beteiligung von Calcineurin, da WNK1 keine entsprechenden Bindungsmotive besitzt. Durch Konkurrenz beider *Scaffold*-Proteine könnte die Regulation der $[Cl^-]_i$ in WNK1 und WNK2 co-exprimierenden Neuronen dynamisch an Schwankungen der $[Ca^{2+}]_i$ gekoppelt werden. Außerdem könnte die Ausprägung neuromodulatorischer Effekte von CNI in WNK2-exprimierenden Neuronen akzentuiert sein.

4.3 Effekte der Calcineurin-Inhibition auf den WNK-SPAK/OSR1-CCC-Signalweg

Als mögliche Ursache der beeinträchtigten neuronalen Cl^- -Homöostase wurden in dieser Arbeit multiple CsA-induzierte Veränderungen der Expression, Abundanz und Phosphorylierung von SPAK/OSR1, KCC2 und NKCC1 identifiziert. Hierzu wurden Hirnlysate von kurzzeitig und chronisch CsA-behandelten WT Wistar-Ratten sowie von $CnA\beta$ - bzw. SPAK-defizienten Mäusen

mittels qPCR, Immunpräzipitation und Western Blot analysiert. Nachfolgend werden die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert.

4.3.1 Kurzzeitige CsA-Applikation

Die einstündige i.p. Applikation von CsA in WT Wistar-Ratten war in dieser Arbeit suffizient, um posttranslationale Modifikationen von SPAK und KCC2 zu induzieren. CsA-behandelte Ratten wiesen im Western Blot bei nicht signifikant veränderter SPAK-Abundanz eine vermehrte aktivierende S383-Phosphorylierung auf. Vereinbar mit einer Aktivierung der SPAK-Kinase war die vermehrte Phosphorylierung der SPAK-abhängigen, inhibitorischen pT1007-KCC2-Stelle bei konstanter KCC2-Abundanz. Als weiterer potenziell beteiligter Faktor konnte eine verstärkte KCC2-Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Keine signifikanten Veränderungen wurden für das aktivierende pS940 des KCC2-Transporters detektiert. Diese Ergebnisse suggerieren eine kurzfristig induzierbare, multifaktorielle KCC2-Inhibition durch CsA-vermittelte Aktivierung der SPAK-Kinase. Zudem kann auch die veränderte KCC2-Tyrosinphosphorylierung über einen in dieser Dissertation nicht erfassten Mechanismus die Inhibition des Transporters vermitteln.

Zunächst lässt sich hieraus die prinzipielle Schlussfolgerung ziehen, dass auch bei intakter Blut-Hirn-Schranke kurzfristige Effekte der Calcineurin-Inhibition im ZNS nachweisbar sind. Frühere Studien stellten in Frage, ob CsA überhaupt in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, da es nicht *post-mortem* in humanem Hirngewebe detektiert werden konnte (138) und die CsA-Akkumulation im ZNS durch P-Glykoprotein-medierte Extrusion stark limitiert wird (139). Jedoch konnte CsA nach oraler und intraperitonealer Applikation sowohl im Gehirn von lungentransplantierten Langschwanzmakaken (140) als auch in den Gehirnen von Wistar-Ratten nachgewiesen werden (141). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass in dieser Dissertation beschriebene posttranslationale Modifikationen nach CsA-Kurzzeitbehandlung direkte Folge der Calcineurin-Inhibition im ZNS aufgrund einer prinzipiell vorhandenen Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für CsA sind.

Funktionell betrachtet sollte die gesteigerte KCC2-Threonin- und Tyrosinphosphorylierung in einer schnellen Inaktivierung und verstärkten Internalisierung des Transporters resultieren (s. 1.5). Diese CsA-induzierten, posttranslationalen Modifikationen sind somit sowohl eine plausible Erklärung für den in 2P-FLIM-Experimenten beschriebenen Anstieg der $[Cl^-]_i$ als auch für die elektrophysiologisch bestimmte Verlängerung der Cl^- -Extrusionszeit in kortikalen Neuronen. Zurückzuführen ist die gesteigerte KCC2-T1007-Phosphorylierung am ehesten auf eine Aktivierung der SPAK-Kinase durch verminderte Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung,

die bereits in der Niere beschrieben wurde (21, 28). Theoretisch könnten jedoch auch SPAK-unabhängige Mechanismen, wie beispielsweise eine direkte Dephosphorylierung der pT1007-Stelle durch Calcineurin, zu einer verminderten KCC2-Funktion unter CsA-Applikation beitragen. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte weiterführend der Effekt der CsA-Anwendung auf die pT1007-KCC2-Phosphorylierung in SPAK-defizienten Mäusen evaluiert werden. Sollte CsA auch in diesem Versuch eine vermehrte KCC2-Threonin-Phosphorylierung induzieren, würde dies einerseits eine direkte Regulation durch Calcineurin suggerieren und andererseits eine weitere pathologische CNI-Wirkung auf molekularer Ebene demonstrieren.

4.3.2 Chronische CsA-Applikation und CnA β -Knockout

Im zweiwöchigen CsA-Behandlungsmodell wurden die Western Blot-Ergebnisse der einstündigen Behandlung reproduziert und erweitert. Korrelativ wurden außerdem Western Blots von Hirnlysaten CnA β -defizienter Mäuse durchgeführt, um CsA-induzierte Effekte tatsächlich auf die Calcineurin-Inhibition und nicht auf eventuelle *Off-Target*-Effekte zurückführen zu können. Des Weiteren wurde durch den selektiven Knockout die Bedeutung der β -Isoform von Calcineurin für die Phosphoregulation von SPAK, KCC2 und NKCC1 charakterisiert.

Analog zu den Resultaten der Kurzzeitbehandlung wiesen CsA-behandelte Ratten und CnA β -defiziente Mäuse eine gesteigerte aktivierende pS383-SPAK-Phosphorylierung sowie eine vermehrte inhibitorische pT1007-KCC2-Phosphorylierung auf. Neben dem direkt durch SPAK phosphorylierten pT1007 war außerdem das vermutlich WNK1-abhängige (123) pT906 nach chronischer CsA-Applikation vermehrt phosphoryliert. Die einzige aktivierende pS940-KCC2-Phosphorylierung war sowohl nach zweiwöchiger CsA-Gabe als auch im CnA β -Knockout deutlich reduziert, obwohl nach einstündiger CsA-Applikation noch keine Veränderung nachweisbar war. Diese Ergebnisse suggerieren einerseits, dass die kurzfristig durch Calcineurin-Inhibition induzierten posttranslationalen Modifikationen von SPAK und KCC2 langfristig bestehen bleiben und nicht kompensiert werden. Andererseits fällt die ausgeprägte Reduktion der S940-KCC2-Phosphorylierung durch langfristige pharmakologische und genetische Calcineurin-Inhibition auf und bedarf einer tiefergehenden Betrachtung.

Eine direkte Regulation dieses Serins durch Calcineurin ist bisher nicht beschrieben und wäre in Anbetracht der Ergebnisse der chronischen CsA-Behandlung auch nicht plausibel. Würde Calcineurin pS940-KCC2 direkt dephosphorylieren, so müsste die CNI-Applikation in einer vermehrten S940-Phosphorylierung resultieren, stattdessen wurde sie durch zweiwöchige CsA-Gabe verringert. Aus vorausgegangenen Studien ist bekannt, dass Proteinkinase C (PKC) und Proteinphosphatase 1 (PP1) die Phosphoregulation der S940-KCC2-Stelle direkt vermitteln

können (102). Sowohl eine CsA-induzierte PKC-Inhibierung als auch PP1-Aktivierung kommen somit als Ursache der verminderten S940-KCC2-Phosphorylierung in Frage. Da Calcineurin jedoch PP1 durch Inaktivierung des Proteinphosphatase 1-Inhibitors aktiviert (142), müssten CNI im Folgeschluss Inhibitoren der PP1 sein und die S940-KCC2-Phosphorylierung vermehren. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der chronischen CsA-Applikation, womit nur eine verminderte PKC-Funktion als logische Erklärung verbleibt.

Interaktionen zwischen Calcineurin und PKC sind vielfältiger Natur. Obwohl diese beiden Enzyme häufig um die (De)-Phosphorylierung der gleichen Serin- und Threoninreste konkurrieren, können sie ihre Aktivität gegenseitig stimulieren (143). Zum Beispiel ist die Calcineurin-abhängige PKC-Dephosphorylierung in Muskelzellen notwendig, um den Transport der PKC in die Plasmamembran zu initiieren, wo sich ihre relevanten Substrate befinden (144). Eine verringerte PKC-Funktion unter CsA-Applikation könnte potenziell durch Veränderungen von *Trafficking*, Phosphorylierung oder Expression der Kinase vermittelt sein und würde in einer verminderten S940-KCC2-Phosphorylierung resultieren. Eine weiterführende Exploration der Hypothese, dass CsA die PKC-Funktion reduziert, sollte sich daher mit Expression, Abundanz und Phosphorylierung sowie subzellulärer Lokalisation der Kinase unter Calcineurin-Inhibition auseinandersetzen. Außerdem sollte versucht werden zu definieren, welche PKC-Isoform relevant für die S940-Phosphorylierung des KCC2-Transporters ist. Potente PKC-Inhibitoren stünden für die Konzeption weiterer Versuche zur Verfügung.

Neben der Evaluation des KCC2-Transporters wurden in beiden Modellen auch Abundanz und Phosphorylierung von NKCC1 bestimmt. Im adulten Gehirn ist NKCC1 für die physiologische Regulation der neuronalen Cl⁻-Homöostase deutlich weniger relevant als KCC2, allerdings ist eine Steigerung der NKCC1-Funktion durch verstärkte Expression oder Phosphorylierung ein potenziell bedeutsamer Mechanismus, der zur Entstehung hoher neuronaler [Cl⁻]_i beitragen kann. Während in dieser Dissertation die Abundanz des Transporters durch chronische CsA-Applikation vermehrt wurde, war im CnA β -Knockout-Modell stattdessen die aktivierende pT212/T217-Phosphorylierung erhöht. Beide Beobachtungen sind mit einem verstärkten NKCC1-vermittelten Cl⁻-Import vereinbar, wobei vermutlich zwei Faktoren zur gesteigerten Phosphorylierung beitragen: SPAK und PP1 sind Regulatoren der pT212/T217-NKCC1-Phosphorylierung. Während SPAK in dieser Arbeit sowohl durch pharmakologische, als auch durch genetische Calcineurin-Inhibition aktiviert wurde, müsste PP1 laut vorausgegangenen Studien hingegen durch CsA inhibiert werden (s. oben). Beide Effekte wären plausible Erklärungen für die gesteigerte NKCC1-Phosphorylierung. Auf Grundlage der diskutierten Ergebnisse wurde in Zusammenschau mit relevanten anderen Studien ein Schema zu potenziellen Auswirkungen der Calcineurin-Inhibition

auf den WNK-SPAK-CCC-Signalweg und die neuronale Cl^- -Homöostase erstellt (s. Abbildung 21).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der molekularbiologischen Versuche für eine multifaktorielle Beteiligung von CsA an der Entstehung neuronaler Übererregbarkeit. Zentraler Mechanismus ist die Aktivierung der SPAK-Kinase, die durch KCC2-Inhibition eine Erhöhung der $[\text{Cl}^-]_i$ in kortikalen Neuronen mit potenziell veränderter synaptischer Inhibition verursacht. Zusätzlich kann dieser Prozess durch die verminderte Aktivität von PP1 und PKC unter langfristiger Calcineurin-Inhibition aggraviert werden. Neben der verminderten KCC2-Funktion ist potenziell auch die gesteigerte NKCC1-Funktion an der Entstehung der neuronalen Cl^- -Akkumulation beteiligt. Sowohl gesteigerte NKCC1-Abundanz als auch -Phosphorylierung können potenziell die $[\text{Cl}^-]_i$ erhöhen und wurden durch pharmakologische sowie genetische Calcineurin-Inhibition generiert.

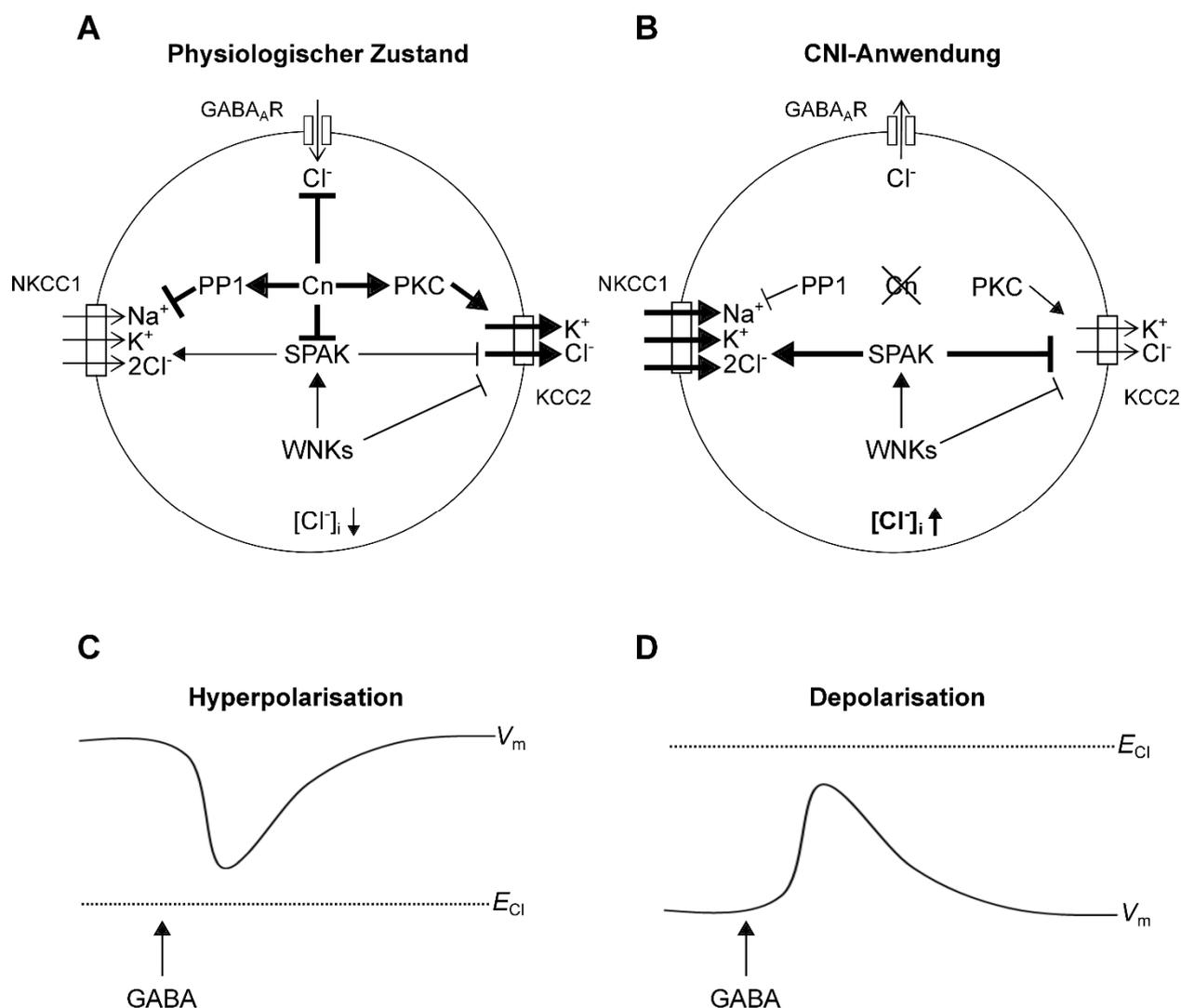


Abbildung 21: Schema abgeleiteter funktioneller Interaktionen von Calcineurin bei der Regulation von KCC2 und NKCC1 in kortikalen Neuronen

(A) Unter physiologischen Bedingungen kann Calcineurin (Cn) den KCC2- und NKCC1-Transporter auf verschiedenen Wegen regulieren. Die Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung der SPAK-Kinase führt zu reduzierter KCC2-Phosphorylierung am inhibitorischen pT1007, gleichzeitig werden die aktivierenden pT212/217-Stellen des NKCC1-Transporters verminderter phosphoryliert. Die potenzielle Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und Proteinphosphatase 1 (PP1) durch Cn resultiert in vermehrter S940-Phosphorylierung an KCC2 und verminderter pT212/217-Phosphorylierung an NKCC1. Der zu erwartende Gesamteffekt wäre eine KCC2-Aktivierung sowie NKCC1-Inhibierung mit konsekutiv niedrigem $[Cl^-]_i$. Darüber hinaus kann die direkte Dephosphorylierung und Inhibierung des GABA_A-Rezeptors (GABA_AR) durch Cn helfen, über die Reduktion einwärtsgerichteter Chloridströme eine niedrige $[Cl^-]_i$ zu etablieren. (B) Calcineurin-Inhibitoren (CNI) kehren den in (A) beschriebenen Effekt um. Durch die verminderte Inhibition der SPAK-Kinase und die verminderte Aktivierung von PP1 und PKC ergibt sich potenziell eine KCC2-Inhibition und NKCC1-Aktivierung. Dies resultiert in einer höheren $[Cl^-]_i$ und konterkariert den Effekt der GABA_A-Rezeptor-Aktivierung, da sich das Chloridumkehrpotenzial (E_{Cl}) in Richtung weniger negativer Werte verschiebt. (C, D) Potenziell zu erwartende Veränderungen des Membranpotenzials V_m nach GABAerger Stimulation unter physiologischen Bedingungen (C) und unter Einfluss von Calcineurin-Inhibitoren (D). Die Öffnung des GABA_A-Rezeptors führt in Abhängigkeit von E_{Cl} (gestrichelte Linie) zu Hyperpolarisation oder Depolarisation.

4.4 Modulation der CsA-Neurotoxizität durch SPAK-Inhibition

Der letzte thematische Abschnitt dieser Arbeit evaluierte die Effekte einer genetischen SPAK-Inhibition auf relevante KCC2- und NKCC1-Phosphorylierungsstellen. Im Western Blot von Hirnlysaten SPAK-defizienter Mäuse konnte im Vergleich zum WT eine verminderte inhibitorische pT1007-KCC2-Phosphorylierung demonstriert werden, während Abundanz, pT906- sowie pS940-Phosphorylierung des Transporters unverändert waren. Dies bestätigt Ergebnisse vorausgegangener Studien, dass SPAK pT1007-KCC2 direkt phosphoryliert, pT906-KCC2 hingegen nicht. Auch das potenziell durch die Serin-/Threoninkinase SPAK phosphorylierbare S940-KCC2 war unverändert, was die Regulation dieser Phosphorylierungsstelle durch andere Kinasen als SPAK, wie beispielsweise PKC, impliziert. Der Nachweis einer reduzierten pT212/T217-NKCC1-Phosphorylierung ist ebenfalls im Einklang mit der gut untersuchten SPAK-abhängigen Regulation von NKCC1 und bestätigt die Effektivität des Knockouts. Auch wenn diese Versuchsreihe noch nicht unter Calcineurin-Inhibition durchgeführt wurde, demonstriert sie den möglichen Benefit der SPAK-Inhibition für die neuronale Cl⁻-Homöostase. Wenn die inhibitorische pT1007-KCC2-Phosphorylierung sowie die aktivierende pT212/217-NKCC1-Phosphorylierung durch Disruption der SPAK-CCC-Interaktion reduziert wird, dann sollte dies in einer Verminderung der neuronalen [Cl⁻]_i resultieren und in Konsequenz die GABAerge Inhibition verstärken. Zukünftige Experimente könnten den protektiven Effekt der SPAK-Defizienz durch CsA-Applikation in SPAK^{-/-} Mäusen prüfen. Hypothetisch sollten diese Mäuse im Vergleich zum WT resistenter gegenüber hyperexzitablen CsA-Effekten sein, was zum Beispiel mittels Elektrophysiologie, Molekularbiologie und Verhaltensexperimenten untersucht werden könnte.

Die neuroprotektive Wirkung genetischer und pharmakologischer SPAK-Inhibition auf die CsA-induzierte Neurotoxizität wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Aylin R. Rodan von der University of Utah an einem *Drosophila melanogaster* Modell evaluiert. Die Ergebnisse sind Teil des noch unveröffentlichten Manuskripts „*Calcineurin facilitates KCC2 function by suppressing WNK-SPAK pathway to prevent neuronal hyperexcitability. (2020)*“ (Zessin M et al., Publikation in Vorbereitung). Für eine Übersicht zum WNK-Fray-KCC-Signalweg in *Drosophila*, dem Ortholog des WNK-SPAK-CCC-Signalwegs, s. 1.6.

Als phänotypisches Maß der neuronalen Erregbarkeit fungierte in diesen Versuchen die Bestimmung der sogenannten *Bang sensitivity*. Hierfür wurden Fliegen in ein leeres Gefäß überführt und für 10 s auf maximaler Stufe gevortext. In gesunden WT-Fliegen ist diese mechanische Stimulation nicht suffizient, um einen epileptischen Anfall zu provozieren. Jegliche

Reduktion der Krampfschwelle kann jedoch zu spontanen Anfällen führen, die als Periode der Lähmung mit konsekutiver Hyperaktivität definiert sind (s. Abbildung 22).



0 µM CsA, Wildtyp

0 µM CsA, kcc^{ML1}

50 µM CsA, kcc^{ML1}

Abbildung 22: Bang sensitivity-Assay in *Drosophila melanogaster*

Screenshots aus Videosequenzen unmittelbar nach mechanischer Stimulation zeigen exemplarisch den Effekt von 50 µM CsA-Applikation auf die neuronale Erregbarkeit von Wildtyp-Fliegen und Trägern der hypomorphen kcc^{ML1} -Mutation. Weiße Pfeile markieren Fliegen mit Krampfanfall.

Initial zeigte sich eine signifikante, wenn auch verhältnismäßig geringe Erhöhung der Krampfanfallsquote in CsA-behandelten WT-Fliegen gegenüber Vehikel-behandelten WT-Fliegen. Dies kann darin begründet sein, dass *Drosophila* einen partiellen KCC-Funktionsverlust kompensieren können. Beispielsweise führt die siRNA-vermittelte Reduktion der KCC-Expression um 75 % nicht zur Veränderung der basalen neuronalen Aktivität im *Drosophila*-ZNS (110). In der Folge wurde auch der genetisch modifizierte kcc^{ML1} -Stamm in die Experimente eingeschlossen, der eine stark reduzierte KCC-Funktion mit inhärent übererregbarem Phänotyp besitzt (111). Hiermit sollte die Hypothese geprüft werden, dass additive CsA-Effekte eine weitere Verschlechterung des Phänotyps induzieren. Tatsächlich führte CsA zu einer dosisabhängigen Steigerung der *Bang sensitivity* in kcc^{ML1} -Fliegen, zum anderen dekompenzierten einige Fliegen durch CsA-Gabe so sehr, dass sie bereits bei geringster mechanischer Stimulation spontane Krampfanfälle erlitten. Die neurotoxischen Effekte der Calcineurin-Inhibition konnten somit auch in *Drosophila* reproduziert werden, was die Grundlage zur weiterführenden Evaluation der SPAK-Inhibition darstellte.

Die pharmakologische SPAK-Inhibition mit dem in der Veterinärmedizin als Anthelminthikum eingesetzten Medikament Closantel (145) zeigte hierbei einerseits neuroprotektive Effekte in der Co-Administration mit CsA, induzierte gleichzeitig jedoch selbst eine erhöhte Anfallsfrequenz in Fliegen, die gar nicht mit CsA stimuliert wurden. Ursache hierfür ist vermutlich die vorbeschriebene inhärente Neurotoxizität von Closantel (146). Nichtsdestotrotz konnte ein prinzipieller Benefit der SPAK-Inhibition auf die CsA-induzierte neuronale Übererregbarkeit

gezeigt werden. Dass eine spezifische SPAK-Inhibition keine neuronale Übererregbarkeit induziert, wurde im letzten Experiment dieser Versuchsreihe nachgewiesen. Durch Kreuzung von heterozygoten Trägern einer Nullmutation des SPAK-Orthologs Fray mit hypomorphen *kcc^{ML1/DHS1}*-Fliegen wurde ein Fliegenstamm generiert, der sowohl über eine stark reduzierte KCC- als auch Fray-Funktion verfügt. Eine CsA-Applikation produzierte in diesem Stamm keinen Anstieg der *Bang sensitivity*. Somit wurde einerseits demonstriert, dass die CsA-induzierte neuronale Übererregbarkeit in *Drosophila* Fray-vermittelt ist und dass andererseits die gezielte Hemmung der Fray-Funktion der Entwicklung neurotoxischer CsA-Effekte antagonisieren kann. Im Gegensatz zur pharmakologischen Fray-Inhibition wurden keine negativen Effekte auf die neuronale Erregbarkeit beobachtet. Ob die pharmakologische oder genetische SPAK-Inhibition auch in Säugetieren ähnliche neuroprotektive Eigenschaften besitzt, sollte in zukünftigen Studien evaluiert werden.

4.5 Methodische Limitationen

Jedes wissenschaftliche Experiment wird durch unterschiedliche Faktoren in seiner Aussagekraft eingeschränkt. Für die kritische Beurteilung der Ergebnisse dieser Dissertation wird an dieser Stelle exemplarisch eine Übersicht wichtiger methodischer Limitationen gegeben.

Durch intrazelluläre Ableitungen mit scharfen Mikroelektroden war es möglich, die Kinetik des neuronalen Cl⁻-Transports per iontophoretischer Cl⁻-Beladung aus KCl-gefüllten Elektroden zu untersuchen. Ein Manko dieser Methodik ist jedoch die Perforation der Zellmembran durch die Mikroelektrode mit potenziellen Implikationen für abgeleitete elektrische Potenziale. Während große Perforationen zum vollständigen Verlust des Membranpotenzials durch ungehinderte Diffusion von Elektrolyten mit dem Extrazellulärraum führen und eine Messung unmöglich machen, können kleine Perforationen Leckströme um die Einstichstelle der Elektrode erzeugen und die Messungen unbemerkt verfälschen. Dieser Faktor kann nur durch Verwendung einer anderen Messmethode, beispielsweise dem sogenannten *Gramicidin-perforated patch*, reduziert werden. Durch Addition des Ionophors Gramicidin zur *Patch*-Elektrodenlösung wird hierbei eine selektive Permeabilität der intakten Zellmembran für monovalente Kationen im *cell attached* Modus generiert, wodurch idealerweise die [Cl⁻]_i unverändert bleibt. Diese Methode ist theoretisch optimal zur Messung GABA-induzierter Potenzialveränderungen, praktisch aber nicht trivial umzusetzen. Die individuelle Effektivität der Gramicidin-Wirkung schwankt zwischen Experimenten und limitiert die Reproduzierbarkeit der Messungen. Bei guter Etablierung wäre diese Methode für zukünftige Studien dennoch eine Aufwertung.

Zentrale Limitation der molekularbiologischen Versuche und insbesondere der Co-IP-Experimente ist die Spezifität der verwendeten Antikörper. Ein idealer Antikörper müsste in der Lage sein, nur ein einziges bekanntes Protein spezifisch zu binden, da selbst eine geringe Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen zu falsch positiven Resultaten führen kann. Dies könnte im Fall der Co-IP mit der Durchführung eines *Pull-Down*-Assays umgangen werden, bei dem die Immobilisation eines Proteins an *Beads* nicht durch Antikörper, sondern genetisch eingebrachte *Tags* wie beispielsweise das Poly-Histidin-*Tag* vermittelt wird. Da nur getaggte Proteine an die *Beads* binden können, sind anschließend detektierte Protein-Protein-Interaktionen spezifischer als die der Co-IP. Allerdings kann auch im *Pull-Down*-Assay nicht eindeutig beantwortet werden, ob Interaktionen direkt oder indirekt über weitere assoziierte Proteine vermittelt sind. Zudem stellt das Einbringen eines *Tags* eine Veränderung der Proteinprimärstruktur dar, wodurch Bindungseigenschaften potenziell verändert werden können. Bei einer weiterführenden Evaluation der WNK2-*Scaffold*-Funktion sollte trotzdem die Möglichkeit eines *Pull-Down*-Assays in Betracht gezogen werden.

Auch die verwendeten Konzentrationen von CsA sind zu diskutieren. Während in den Versuchen *in vivo* vorwiegend suprathérapeutische CsA-Dosierungen von 25 mg/kg KG verwendet wurden, um eine Akzentuierung der pathologischen Wirkung zu erzielen, könnten in zukünftigen Arbeiten die Effekte therapeutischer Dosierungen evaluiert werden. Die im chronischen Behandlungsmodell bei 5 mg/kg KG CsA nachweisbare Reduktion der S940-KCC2-Phosphorylierung suggeriert Effekte der Calcineurin-Inhibition auch im therapeutischen Bereich. *In vitro* postulierte eine pharmakokinetische Studie eine Wirksamkeit von CsA bei ausgeschalteter Blut-Hirn-Schranke bei Konzentrationen ab 0,2 μM (147). Die in dieser Dissertation verwendete Konzentration lag mit 10 μM in einem Bereich über der hypothetischen Minimaldosis. Eine Reproduktion der Versuche mit einer niedrigeren CsA-Dosis (z.B. 1,0 μM) wäre wahrscheinlich eher vergleichbar mit der CsA-Konzentration im ZNS von humanen Patienten und würde die Ergebnisse dieser Arbeit hervorragend ergänzen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Dissertation vorgelegten Versuche beleuchten neue funktionelle Aspekte der Calcineurin-vermittelten Regulation des KCC2-Transporters und etablieren einen molekularen Pathomechanismus der Neurotoxizität von CsA. Durch seine Funktion als endogener Inhibitor der WNK-SPAK-CCC-Kaskade unterstützt Calcineurin die KCC2-Aktivierung. Die pharmakologische Inhibition der Phosphatase resultiert dementsprechend in einer Aktivierung des WNK-SPAK-CCC-Signalwegs mit konsekutiver Inhibierung des KCC2-Transporters und Cl⁻-Akkumulation in kortikalen Pyramidenzellen. Durch SPAK-Inhibition könnten die neurotoxischen Effekte potenziell gemildert werden. Diese Thesen stützen sich auf die folgenden, erstmalig beschriebenen Beobachtungen: 1) In kortikalen Pyramidenzellen bewirkt die CsA-Applikation eine Erhöhung der [Cl⁻]_i. Dies lässt sich auf eine verringerte Cl⁻-Extrusionskapazität zurückführen. 2) Calcineurin bildet mit SPAK, KCC2 und NKCC1 einen multimolekularen Komplex um WNK2, wodurch sich direkte und indirekte Regulationsmöglichkeiten der [Cl⁻]_i durch die Ca²⁺-abhängige Phosphatase ergeben. 3) Kurz- und langfristige CsA-Applikation führt im Gehirn der Wistar-Ratte zu einer Zunahme der aktivierenden SPAK-Phosphorylierung und der SPAK-abhängigen, inhibitorischen KCC2-Threonin-Phosphorylierung. Ein zweiter, vermutlich durch Reduktion der PKC-Aktivität bedingter, Mechanismus reduziert zudem die aktivierende KCC2-Serin-Phosphorylierung. 4) Diese posttranslationalen Modifikationen sind durch Inhibition der β-Isoform von Calcineurin vermittelt, da sie durch CnAβ-Knockout in Mäusen reproduzierbar sind. 5) Die genetische SPAK-Deletion reduziert die inhibitorische KCC2-Threoninphosphorylierung, was eine KCC2-Aktivierung durch SPAK-Inhibition suggeriert. Abbildung 21 zeigt das daraus abgeleitete Schema.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich Implikationen für eine potenzielle, zukünftige Pharmakotherapie neurologischer UAW unter CNI-Applikation. Hypothetisch könnte durch Inhibition der SPAK-Kinase oder direkte Aktivierung des KCC2-Transporters der Cl⁻-Auswärtstransport in kortikalen Neuronen wiederhergestellt, eine physiologische niedrige [Cl⁻]_i restituiert und die zelluläre Erregbarkeit normalisiert werden. Da die Dysregulation der neuronalen Cl⁻-Homöostase auch unabhängig von der Calcineurin-Inhibition in der Pathogenese diverser neurologischer Erkrankungen impliziert ist, wurden sowohl SPAK als auch KCC2 in vorausgegangenen Studien bereits als potenzielle Ziele einer spezifischen Pharmakotherapie evaluiert (101, 148).

Theoretisch besitzen direkte Aktivatoren des KCC2-Transporters das Potenzial, CNI-induzierte neurotoxische Effekte zu antagonisieren und gleichzeitig eine neue Klasse antiepileptischer

Medikamente zu begründen. Jedoch konnten bisher trotz intensiver Forschungsbemühungen keine allosterischen KCC2-Aktivatoren synthetisiert werden. Lediglich auf das *small molecule* CLP257, welches mutmaßlich über eine Verlängerung der Halbwertszeit von KCC2 in der Plasmamembran zu einer verbesserten neuronalen Cl⁻-Extrusion führt (149), könnte in zukünftigen Studien zurückgegriffen werden.

Die indirekte KCC2-Aktivierung durch Applikation von SPAK-Inhibitoren ist hingegen ein vielversprechender Ansatz. Closantel besitzt analgetische Eigenschaften und ist in der Lage, die neuronale [Cl⁻]_i durch Restitution der KCC2-Aktivität zu senken (150). Im Einklang mit den Ergebnissen der in dieser Dissertation diskutierten *Drosophila*-Experimente wird so der prinzipielle Nutzen der pharmakologischen SPAK-Inhibition im Kontext einer fehlregulierten neuronalen Cl⁻-Homöostase verdeutlicht. Ein großer Vorbehalt aus klinischer Sicht ist jedoch die geringe therapeutische Breite von Closantel im Menschen. Fallberichte schildern schwerwiegende toxische Effekte der akzidentellen Einnahme bis hin zur vollständigen Erblindung innerhalb weniger Tage (151). Die klinische Closantel-Applikation zur Therapie der CNI-Neurotoxizität erscheint somit unwahrscheinlich, wenngleich die Anwendbarkeit in Tierversuchen gegeben ist. Langfristig gesehen stellt die Entwicklung eines spezifischeren SPAK-Inhibitors mit besserem UAW-Profil eine mögliche therapeutische Option dar, von der mit CNI immunsupprimierte Patienten profitieren könnten.

Literaturverzeichnis

1. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, McKenzie N, Stiller CR. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Can Med Assoc J.* 1982;126(9):1041-6.
2. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs.* 1993;45(6):953-1040.
3. Grigoriu S, Bond R, Cossio P, Chen JA, Ly N, Hummer G, Page R, Cyert MS, Peti W. The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol.* 2013;11(2):e1001492.
4. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Rolles K. Cyclosporin A in clinical kidney grafting from cadaver donors. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1979;16:305-9.
5. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List, 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
6. Hoskova L, Malek I, Kopkan L, Kautzner J. Pathophysiological mechanisms of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and arterial hypertension. *Physiol Res.* 2017;66(2):167-80.
7. Dhar R. Neurologic Complications of Transplantation. *Neurocrit Care.* 2018;28(1):4-11.
8. Anghel D, Tanasescu R, Campeanu A, Lupescu I, Podda G, Bajenaru O. Neurotoxicity of immunosuppressive therapies in organ transplantation. *Maedica (Buchar).* 2013;8(2):170-5.
9. Pustavoitau A, Bhardwaj A, Stevens R. Neurological complications of transplantation. *J Intensive Care Med.* 2011;26(4):209-22.
10. Senzolo M, Ferronato C, Burra P. Neurologic complications after solid organ transplantation. *Transpl Int.* 2009;22(3):269-78.
11. Bronster DJ, Emre S, Boccagni P, Sheiner PA, Schwartz ME, Miller CM. Central nervous system complications in liver transplant recipients--incidence, timing, and long-term follow-up. *Clin Transplant.* 2000;14(1):1-7.
12. Navarro V, Varnous S, Galanaud D, Vaissier E, Granger B, Gandjbakhch I, Baulac M. Incidence and risk factors for seizures after heart transplantation. *J Neurol.* 2010;257(4):563-8.
13. Fugate JE, Rabinstein AA. Posterior reversible encephalopathy syndrome: clinical and radiological manifestations, pathophysiology, and outstanding questions. *Lancet Neurol.* 2015;14(9):914-25.
14. Dawson TM. Immunosuppressants, immunophilins, and the nervous system. *Ann Neurol.* 1996;40(4):559-60.
15. Hinchey J, Chaves C, Appignani B, Breen J, Pao L, Wang A, Pessin MS, Lamy C, Mas JL, Caplan LR. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *N Engl J Med.* 1996;334(8):494-500.

-
16. Bartynski WS, Tan HP, Boardman JF, Shapiro R, Marsh JW. Posterior reversible encephalopathy syndrome after solid organ transplantation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(5):924-30.
 17. Wong R, Beguelin GZ, de Lima M, Giralt SA, Hosing C, Ippoliti C, Forman AD, Kumar AJ, Champlin R, Couriel D. Tacrolimus-associated posterior reversible encephalopathy syndrome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2003;122(1):128-34.
 18. Siegal D, Keller A, Xu W, Bhuta S, Kim DH, Kuruvilla J, Lipton JH, Messner H, Gupta V. Central nervous system complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, manifestations, and clinical significance. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(11):1369-79.
 19. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 1991;66(4):807-15.
 20. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB, Strom TB. Cyclosporine: a new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med.* 1984;101(5):667-82.
 21. Blankenstein KI, Borschewski A, Labes R, Paliege A, Boldt C, McCormick JA, Ellison DH, Bader M, Bachmann S, Mutig K. Calcineurin inhibitor cyclosporine A activates renal Na-K-Cl cotransporters via local and systemic mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(3):F489-F501.
 22. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg A, Yang CL, Roeschel T, Paliege A, Howie AJ, Conley J, Bachmann S, Unwin RJ, Ellison DH. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med.* 2011;17(10):1304-9.
 23. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1483-521.
 24. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(12):6270-3.
 25. Hemenway CS, Heitman J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys.* 1999;30(1):115-51.
 26. Kuno T, Mukai H, Ito A, Chang CD, Kishima K, Saito N, Tanaka C. Distinct cellular expression of calcineurin A alpha and A beta in rat brain. *J Neurochem.* 1992;58(5):1643-51.
 27. Klee CB, Krinks MH, Manalan AS, Cohen P, Stewart AA. Isolation and characterization of bovine brain calcineurin: a calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Methods Enzymol.* 1983;102:227-44.
 28. Borschewski A, Himmerkus N, Boldt C, Blankenstein KI, McCormick JA, Lazelle R, Willnow TE, Jankowski V, Plain A, Bleich M, Ellison DH, Bachmann S, Mutig K. Calcineurin and Sorting-Related Receptor with A-Type Repeats Interact to Regulate the Renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) Cotransporter. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):107-19.
 29. Ke H, Huai Q. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(4):1095-102.
 30. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13367-70.
 31. Aitken A, Klee CB, Cohen P. The structure of the B subunit of calcineurin. *Eur J Biochem.* 1984;139(3):663-71.
 32. Tumlin JA. Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(6):884-95.

-
33. Rumi-Masante J, Rusinga FI, Lester TE, Dunlap TB, Williams TD, Dunker AK, Weis DD, Creamer TP. Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *J Mol Biol.* 2012;415(2):307-17.
 34. Walsh CT, Zydowsky LD, McKeon FD. Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. *J Biol Chem.* 1992;267(19):13115-8.
 35. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest.* 2000;105(10):1395-406.
 36. Wang J, Liu S, Haditsch U, Tu W, Cochrane K, Ahmadian G, Tran L, Paw J, Wang Y, Mansuy I, Salter MM, Lu YM. Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses. *J Neurosci.* 2003;23(3):826-36.
 37. Roy J, Cyert MS. Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal.* 2009;2(100):re9.
 38. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003;17(18):2205-32.
 39. Williams CR, Gooch JL. Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms. *Expert Rev Mol Med.* 2012;14:e14.
 40. Laine J, Holmberg C. Renal and adrenal mechanisms in cyclosporine-induced hyperkalaemia after renal transplantation. *Eur J Clin Invest.* 1995;25(9):670-6.
 41. Bazua-Valenti S, Castaneda-Bueno M, Gamba G. Physiological role of SLC12 family members in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(1):F131-44.
 42. Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdorfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal.* 2014;7(334):re3.
 43. Kahle KT, Deeb TZ, Puskarjov M, Silayeva L, Liang B, Kaila K, Moss SJ. Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends Neurosci.* 2013;36(12):726-37.
 44. Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008;4(9):490-503.
 45. Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev.* 2005;85(2):423-93.
 46. Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(10):637-54.
 47. Deisz RA, Lux HD. The role of intracellular chloride in hyperpolarizing post-synaptic inhibition of crayfish stretch receptor neurones. *J Physiol.* 1982;326:123-38.
 48. Thompson SM, Deisz RA, Prince DA. Relative contributions of passive equilibrium and active transport to the distribution of chloride in mammalian cortical neurons. *J Neurophysiol.* 1988;60(1):105-24.
 49. Chen L, Wan L, Wu Z, Ren W, Huang Y, Qian B, Wang Y. KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. *Sci Rep.* 2017;7(1):156.

-
50. Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2007;27(37):9866-73.
51. Payne JA, Stevenson TJ, Donaldson LF. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem*. 1996;271(27):16245-52.
52. Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Pruunsild P, Kaila K, Delpire E, Timmusk T, Rivera C, Airaksinen MS. A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Biol Chem*. 2007;282(42):30570-6.
53. Uvarov P, Ludwig A, Markkanen M, Soni S, Hubner CA, Rivera C, Airaksinen MS. Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13696-704.
54. Piechotta K, Lu J, Delpire E. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem*. 2002;277(52):50812-9.
55. Strange K, Singer TD, Morrison R, Delpire E. Dependence of KCC2 K-Cl cotransporter activity on a conserved carboxy terminus tyrosine residue. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(3):C860-7.
56. Deisz RA, Lehmann TN, Horn P, Dehnicke C, Nitsch R. Components of neuronal chloride transport in rat and human neocortex. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1317-47.
57. Medina I, Friedel P, Rivera C, Kahle KT, Kourdougli N, Uvarov P, Pellegrino C. Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:27.
58. Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hubner CA. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol*. 2004;468(1):57-64.
59. Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci*. 2002;16(12):2358-70.
60. Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*. 2005;11(11):1205-13.
61. Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*. 2001;30(2):515-24.
62. Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM, Delpire E. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus*. 2002;12(2):258-68.
63. Zhu L, Lovinger D, Delpire E. Cortical neurons lacking KCC2 expression show impaired regulation of intracellular chloride. *J Neurophysiol*. 2005;93(3):1557-68.
64. Tornberg J, Voikar V, Savilahti H, Rauvala H, Airaksinen MS. Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. *Eur J Neurosci*. 2005;21(5):1327-37.
65. Puskarjov M, Seja P, Heron SE, Williams TC, Ahmad F, Iona X, Oliver KL, Grinton BE, Vutskits L, Scheffer IE, Petrou S, Blaesse P, Dibbens LM, Berkovic SF, Kaila K. A variant of KCC2

from patients with febrile seizures impairs neuronal Cl⁻ extrusion and dendritic spine formation. *EMBO Rep.* 2014;15(6):723-9.

66. Kahle KT, Merner ND, Friedel P, Silayeva L, Liang B, Khanna A, Shang Y, Lachance-Touchette P, Bourassa C, Levert A, Dion PA, Walcott B, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Hodgkinson A, Awadalla P, Nikbakht H, Majewski J, Cossette P, Deeb TZ, Moss SJ, Medina I, Rouleau GA. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Rep.* 2014;15(7):766-74.
67. Stodberg T, McTague A, Ruiz AJ, Hirata H, Zhen J, Long P, Farabella I, Meyer E, Kawahara A, Vassallo G, Stivaros SM, Bjursell MK, Stranneheim H, Tigerschiold S, Persson B, Bangash I, Das K, Hughes D, Lesko N, Lundeberg J, Scott RC, Poduri A, Scheffer IE, Smith H, Gissen P, Schorge S, Reith ME, Topf M, Kullmann DM, Harvey RJ, Wedell A, Kurian MA. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat Commun.* 2015;6:8038.
68. Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Cresto N, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med.* 2014;6(244):244ra89.
69. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):91-105.
70. Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC. Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17713-22.
71. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(6):F1143-59.
72. Kaplan MR, Plotkin MD, Lee WS, Xu ZC, Lytton J, Hebert SC. Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int.* 1996;49(1):40-7.
73. Praetorius J, Nielsen S. Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(1):C59-67.
74. Garg P, Martin CF, Elms SC, Gordon FJ, Wall SM, Garland CJ, Sutliff RL, O'Neill WC. Effect of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 on systemic blood pressure and smooth muscle tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(5):H2100-5.
75. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet.* 1999;22(2):192-5.
76. Wouters M, De Laet A, Donck LV, Delpire E, van Bogaert PP, Timmermans JP, de Kerchove d'Exaerde A, Smans K, Vanderwinden JM. Subtractive hybridization unravels a role for the ion cotransporter NKCC1 in the murine intestinal pacemaker. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(6):G1219-27.
77. Darman RB, Flemmer A, Forbush B. Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34359-62.
78. Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol.* 1997;33(6):781-95.

-
79. Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E. NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res.* 2008;79(2-3):201-12.
80. Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL, Shull GE. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem.* 1999;274(38):26946-55.
81. Koumangoye R, Omer S, Kabeer MH, Delpire E. Novel human NKCC1 mutations cause defects in goblet cells mucus secretion and chronic inflammation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019.
82. Macnamara EF, Koehler AE, D'Souza P, Estwick T, Lee P, Vezina G, Undiagnosed Diseases N, Fauni H, Braddock SR, Torti E, Holt JM, Sharma P, Malicdan MCV, Tiffit CJ. Kilquist syndrome: A novel syndromic hearing loss disorder caused by homozygous deletion of SLC12A2. *Hum Mutat.* 2019;40(5):532-8.
83. Dzhala VI, Kuchibhotla KV, Glykys JC, Kahle KT, Swiercz WB, Feng G, Kuner T, Augustine GJ, Bacskai BJ, Staley KJ. Progressive NKCC1-dependent neuronal chloride accumulation during neonatal seizures. *J Neurosci.* 2010;30(35):11745-61.
84. Reid AY, Riazi K, Campbell Teskey G, Pittman QJ. Increased excitability and molecular changes in adult rats after a febrile seizure. *Epilepsia.* 2013;54(4):e45-8.
85. Liang B, Huang JH. Elevated NKCC1 transporter expression facilitates early post-traumatic brain injury seizures. *Neural Regen Res.* 2017;12(3):401-2.
86. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16795-801.
87. Rinehart J, Vazquez N, Kahle KT, Hodson CA, Ring AM, Gulcicek EE, Louvi A, Bobadilla NA, Gamba G, Lifton RP. WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters. *J Biol Chem.* 2011;286(34):30171-80.
88. Bazua-Valenti S, Chavez-Canales M, Rojas-Vega L, Gonzalez-Rodriguez X, Vazquez N, Rodriguez-Gama A, Argaiz ER, Melo Z, Plata C, Ellison DH, Garcia-Valdes J, Hadchouel J, Gamba G. The Effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1781-6.
89. Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ. Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal.* 2014;7(324):ra41.
90. Rodan AR, Jenny A. WNK Kinases in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol.* 2017;123:1-47.
91. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42685-93.
92. Gagnon KB, England R, Delpire E. Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. *Mol Cell Biol.* 2006;26(2):689-98.
93. Vitari AC, Deak M, Morrice NA, Alessi DR. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J.* 2005;391(Pt 1):17-24.

-
94. de Los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, Campbell DG, Deak M, Macartney TJ, Kahle KT, Zhang J. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *Biochem J.* 2014;458(3):559-73.
95. Delpire E, Gagnon KB. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem J.* 2008;409(2):321-31.
96. Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(46):16783-8.
97. Watanabe M, Zhang J, Mansuri MS, Duan J, Karimy JK, Delpire E, Alper SL, Lifton RP, Fukuda A, Kahle KT. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival. *Sci Signal.* 2019;12(603).
98. Pisella LI, Gaiarsa JL, Diabira D, Zhang J, Khalilov I, Duan J, Kahle KT, Medina I. Impaired regulation of KCC2 phosphorylation leads to neuronal network dysfunction and neurodevelopmental pathology. *Sci Signal.* 2019;12(603).
99. Moore YE, Conway LC, Wobst HJ, Brandon NJ, Deeb TZ, Moss SJ. Developmental Regulation of KCC2 Phosphorylation Has Long-Term Impacts on Cognitive Function. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:173.
100. Moore YE, Deeb TZ, Chadchankar H, Brandon NJ, Moss SJ. Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(40):10166-71.
101. Kahle KT, Delpire E. Kinase-KCC2 coupling: Cl⁻ rheostasis, disease susceptibility, therapeutic target. *J Neurophysiol.* 2016;115(1):8-18.
102. Lee HH, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29777-84.
103. Puskarjov M, Ahmad F, Kaila K, Blaesse P. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. *J Neurosci.* 2012;32(33):11356-64.
104. Lee HH, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABA_A receptor-mediated currents. *Nat Neurosci.* 2011;14(6):736-43.
105. Lee HH, Jurd R, Moss SJ. Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Mol Cell Neurosci.* 2010;45(2):173-9.
106. Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J. Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci.* 2007;27(7):1642-50.
107. Dijkers PF, O'Farrell PH. *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses. *Curr Biol.* 2007;17(23):2087-93.
108. Li YX, Dijkers PF. Specific calcineurin isoforms are involved in *Drosophila* toll immune signaling. *J Immunol.* 2015;194(1):168-76.
109. Rodan AR. WNK-SPAK/OSR1 signaling: lessons learned from an insect renal epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018;315(4):F903-F7.

-
110. Chen R, Prael F, Li Z, Delpire E, Weaver CD, Swale D. Functional Coupling of K⁺-Cl⁻ Cotransporter (KCC) to GABA-Gated Cl⁻ Channels in the Central Nervous System of *Drosophila melanogaster* leads to altered drug sensitivities. *ACS Chem Neurosci*. 2019.
111. Hekmat-Scafe DS, Lundy MY, Ranga R, Tanouye MA. Mutations in the K⁺/Cl⁻ cotransporter gene *kazachoc* (*kcc*) increase seizure susceptibility in *Drosophila*. *J Neurosci*. 2006;26(35):8943-54.
112. Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Aβ₂-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4586-91.
113. McCormick JA, Mutig K, Nelson JH, Saritas T, Hoorn EJ, Yang CL, Rogers S, Curry J, Delpire E, Bachmann S, Ellison DH. A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure. *Cell Metab*. 2011;14(3):352-64.
114. Schmitt R, Klussmann E, Kahl T, Ellison DH, Bachmann S. Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(5):F1097-104.
115. Marandi N, Konnerth A, Garaschuk O. Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices. *Pflugers Arch*. 2002;445(3):357-65.
116. Krapf R, Berry CA, Verkman AS. Estimation of intracellular chloride activity in isolated perfused rabbit proximal convoluted tubules using a fluorescent indicator. *Biophys J*. 1988;53(6):955-62.
117. Kovalchuk Y, Garaschuk O. Two-photon chloride imaging using MQAE in vitro and in vivo. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012;2012(7):778-85.
118. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
119. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
120. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195-203.
121. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
122. Mutig K, Paliege A, Kahl T, Jons T, Muller-Esterl W, Bachmann S. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293(4):F1166-77.
123. Friedel P, Kahle KT, Zhang J, Hertz N, Pisella LI, Buhler E, Schaller F, Duan J, Khanna AR, Bishop PN, Shokat KM, Medina I. WNK1-regulated inhibitory phosphorylation of the KCC2 cotransporter maintains the depolarizing action of GABA in immature neurons. *Sci Signal*. 2015;8(383):ra65.
124. Famiglio L, Racusen L, Fivush B, Solez K, Fisher R. Central nervous system toxicity of cyclosporine in a rat model. *Transplantation*. 1989;48(2):316-21.
125. Wong M, Yamada KA. Cyclosporine induces epileptiform activity in an in vitro seizure model. *Epilepsia*. 2000;41(3):271-6.

-
126. Gorji A, Scheld HH, Speckmann EJ. Epileptogenic effect of cyclosporine in guinea-pig hippocampal slices. *Neuroscience*. 2002;115(4):993-7.
127. Jung S, Yang H, Kim BS, Chu K, Lee SK, Jeon D. The immunosuppressant cyclosporin A inhibits recurrent seizures in an experimental model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 2012;529(2):133-8.
128. Setkowicz Z, Ciarach M. Neuroprotectants FK-506 and cyclosporin A ameliorate the course of pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res*. 2007;73(2):151-5.
129. Cho TH, Aguetaz P, Campuzano O, Charriaut-Marlangue C, Riou A, Berthezene Y, Nighoghossian N, Ovize M, Wiart M, Chauveau F. Pre- and post-treatment with cyclosporine A in a rat model of transient focal cerebral ischaemia with multimodal MRI screening. *Int J Stroke*. 2013;8(8):669-74.
130. Scheff SW, Sullivan PG. Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *J Neurotrauma*. 1999;16(9):783-92.
131. Nakamura Y, Darnieder LM, Deeb TZ, Moss SJ. Regulation of GABAARs by phosphorylation. *Adv Pharmacol*. 2015;72:97-146.
132. Wang A, Chi Z, Wang S, Wang S, Sun Q. Calcineurin-mediated GABA(A) receptor dephosphorylation in rats after kainic acid-induced status epilepticus. *Seizure*. 2009;18(7):519-23.
133. Niemann CU, Saeed M, Akbari H, Jacobsen W, Benet LZ, Christians U, Serkova N. Close association between the reduction in myocardial energy metabolism and infarct size: dose-response assessment of cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(3):1123-8.
134. Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 1994;26(5):509-17.
135. Serkova NJ, Christians U, Benet LZ. Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity. *Mol Interv*. 2004;4(2):97-107.
136. Markkanen M, Ludwig A, Khirug S, Pryazhnikov E, Soni S, Khiroug L, Delpire E, Rivera C, Airaksinen MS, Uvarov P. Implications of the N-terminal heterogeneity for the neuronal K-Cl cotransporter KCC2 function. *Brain Res*. 2017;1675:87-101.
137. Heubl M, Zhang J, Pressey JC, Al Awabdh S, Renner M, Gomez-Castro F, Moutkine I, Eugene E, Russeau M, Kahle KT, Poncer JC, Levi S. GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl(-)-sensitive WNK1 kinase. *Nat Commun*. 2017;8(1):1776.
138. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Carlson IH, Subramanian R. Concentrations of cyclosporin A and its metabolites in human tissues postmortem. *J Anal Toxicol*. 1991;15(3):110-5.
139. Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(6):1096-9.
140. Serkova N, Hausen B, Berry GJ, Jacobsen W, Benet LZ, Morris RE, Christians U. Tissue distribution and clinical monitoring of the novel macrolide immunosuppressant SDZ-RAD and its metabolites in monkey lung transplant recipients: interaction with cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(1):323-32.

-
141. Serkova N, Litt L, James TL, Sadee W, Leibfritz D, Benet LZ, Christians U. Evaluation of individual and combined neurotoxicity of the immunosuppressants cyclosporine and sirolimus by in vitro multinuclear NMR spectroscopy. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(2):800-6.
142. Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature.* 1994;369(6480):486-8.
143. Aronowski J, Grotta JC, Strong R, Waxham MN. Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20(2):343-9.
144. Vincent F, Duquesnes N, Christov C, Damy T, Samuel JL, Crozatier B. Dual level of interactions between calcineurin and PKC-epsilon in cardiomyocyte stretch. *Cardiovasc Res.* 2006;71(1):97-107.
145. AlAmri MA, Kadri H, Alderwick LJ, Simpkins NS, Mehellou Y. Rafoxanide and Closantel Inhibit SPAK and OSR1 Kinases by Binding to a Highly Conserved Allosteric Site on Their C-terminal Domains. *ChemMedChem.* 2017;12(9):639-45.
146. Swan GE. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *J S Afr Vet Assoc.* 1999;70(2):61-70.
147. Bellwon P, Culot M, Wilmes A, Schmidt T, Zurich MG, Schultz L, Schmal O, Gramowski-Voss A, Weiss DG, Jennings P, Bal-Price A, Testai E, Dekant W. Cyclosporine A kinetics in brain cell cultures and its potential of crossing the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro.* 2015;30(1 Pt A):166-75.
148. Huang H, Song S, Banerjee S, Jiang T, Zhang J, Kahle KT, Sun D, Zhang Z. The WNK-SPAK/OSR1 Kinases and the Cation-Chloride Cotransporters as Therapeutic Targets for Neurological Diseases. *Aging Dis.* 2019;10(3):626-36.
149. Gagnon M, Bergeron MJ, Lavertu G, Castonguay A, Tripathy S, Bonin RP, Perez-Sanchez J, Boudreau D, Wang B, Dumas L, Valade I, Bachand K, Jacob-Wagner M, Tardif C, Kianicka I, Isenring P, Attardo G, Coull JA, De Koninck Y. Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. *Nat Med.* 2013;19(11):1524-8.
150. Gao JL, Peng K, Shen MW, Hou YH, Qian XB, Meng XW, Ji FH, Wang LN, Yang JP. Suppression of WNK1-SPAK/OSR1 Attenuates Bone Cancer Pain by Regulating NKCC1 and KCC2. *J Pain.* 2019.
151. Tabatabaei SA, Soleimani M, Mansouri MR, Mirshahi A, Inanlou B, Abrishami M, Pakrah AR, Masarat H. Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans. *BMC Ophthalmol.* 2016;16(1):207.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Michael Zessin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Auswirkungen der Calcineurin-Inhibition auf die posttranslationale Modifikation der Kationen-Chlorid-Kotransporter im Neocortex / Effects of calcineurin inhibition on the posttranslational modification of neocortical cation-chloride cotransporters“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Der Doktorand Michael Zessin hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Zessin M, Strauß U, Deisz RA, Rodan AR, Pleinis JM, Borschewski A, Giesecke T, Loyola S, Schindler M, Endlich N, Mrowka R, Maillet M, McCormick JA, Mutig K, (2019). Calcineurin Inhibition Impairs the Function of Neuronal Potassium-Chloride Cotransporter 2. FASEB J.33, No. 1_supplement: 824.14. Experimental Biology 2019, Orlando (FL)

Beitrag im Einzelnen: Abstrakt, Vortrag und Poster wurden eigenständig von mir verfasst und auf dem Kongress Experimental Biology 2019 in Orlando vorgetragen. Die präsentierten Daten aus qPCR-, Western Blot-, Co-IP-, Immunhistochemie- sowie 2P-FLIM-Experimenten wurden zu großem Anteil von mir erhoben. Die Auswertung und statistische Evaluation dieser Experimente sowie ihre graphische Darstellung wurden selbstständig von mir durchgeführt.

Publikation 2: Zessin M, Boldt C, Deisz RA, Blankenstein K, Bachmann S, Mutig K, (2015). Calcineurin Inhibitor Cyclosporine Inhibits the Neuronal K-Cl Co-transporter KCC2. FASEB J.29, No. 1_supplement: 845.18. Experimental Biology 2015, Boston (MA)

Beitrag im Einzelnen: Abstrakt und Poster wurden eigenständig von mir verfasst und auf dem Kongress Experimental Biology 2015 in Boston vorgetragen. Die präsentierten Daten aus qPCR-, Western Blot-, Co-IP- sowie Immunhistochemie-Experimenten wurden zu großem Anteil von mir erhoben. Die Auswertung und statistische Evaluation dieser Experimente sowie ihre graphische Darstellung wurden selbstständig von mir durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Konferenzbeiträge

Zessin M, Strauß U, Deisz RA, Rodan AR, Pleinis JM, Borschewski A, Giesecke T, Loyola S, Schindler M, Endlich N, Mrowka R, Maillet M, McCormick JA, Mutig K, (2019).

Calcineurin Inhibition Impairs the Function of Neuronal Potassium-Chloride Cotransporter 2. FASEB J.33, No. 1_supplement: 824.14. Experimental Biology 2019, Orlando (FL)

(Abstrakt, Poster und Vortrag)

Zessin M, Boldt C, Deisz RA, Loyola S, Strauß U, Boehm M, Blankenstein K, Borschewski A, Bachmann S, Mutig K, (2015).

Cyclosporine inhibits the neuronal K-Cl co-transporter. 110. Jahrestreffen Anatomische Gesellschaft, Würzburg (nicht gesondert veröffentlicht)

(Abstrakt und Vortrag)

Zessin M, Boldt C, Deisz RA, Blankenstein K, Bachmann S, Mutig K, (2015).

Calcineurin Inhibitor Cyclosporine Inhibits the Neuronal K-Cl Co-transporter KCC2.

FASEB J.29, No. 1_supplement: 845.18. Experimental Biology 2015, Boston (MA)

(Abstrakt und Poster)

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. habil. Kerim Mutig vielmals für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Sein unerschütterlicher Optimismus war einerseits Grundlage für die Konzeption dieser Dissertation und andererseits auch wesentlich für Ihre Vollendung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sebastian Bachmann, der in einer für ihn neuen Rolle als Zweitbetreuer fungierte. Von seinen freundschaftlich zur richtigen Zeit vorgetragenen Ratschlägen sowie seinem aufmerksamen Korrekturlesen profitierte das Projekt ungemein.

Ich möchte mich außerdem bei allen Kooperationspartnern bedanken, ohne deren Beiträge diese Promotion unmöglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich hierbei die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Deisz und Herrn PD Dr. med. habil. Ulf Strauß hervorheben. Ihre fachliche Kompetenz auf dem Gebiet der Neurologie und Elektrophysiologie war für das Gelingen des Projekts so unverzichtbar wie die Geduld, die sie mir entgegenbrachten. Mein Dank geht des Weiteren an Aylin Rodan und John Pleinis für die Durchführung der *Drosophila*-Experimente sowie an Jim McCormick und Marjorie Maillet für die Bereitstellung der genetisch modifizierten Mausmodelle.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Arbeitskollegen der AG Bachmann, mit denen ich über die Jahre das Vergnügen hatte, gemeinsam zu forschen. Frau Dr. Christin Boldt danke ich für meine Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken. Ebenso wichtig waren aber auch die von einer Tasse Kaffee begleiteten Gespräche mit Dr. Anna Steinborn, Dr. Stefanie Lommatzsch, Dr. Katharina Blankenstein, Dr. Aljona Borschewski, Robert Labes, Alejandro Müller, Martin Thomson und allen, die mir verzeihen mögen, wenn sie aus Platzgründen hier nicht persönlich erwähnt werden. In Torsten Giesecke hatte ich darüber hinaus einen medizinischen Mitstreiter, der ähnliche Hürden wie ich zu bewältigen hatte und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die exzellente technische Assistenz danke ich Frauke Grams, Kerstin Riskowsky, Katja Dörfel und Jutta Schüler. Unserer Sekretärin Frau Anette Drobbe danke ich für Ihre Allwissenheit.

Zum Abschluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei all denen bedanken, die mich außerhalb des Labors unterstützt und in schwierigen Phasen an mich geglaubt haben. Meine Familie, meine liebe Iulia, meine Freunde aus dem Studium und dem Handballverein – danke, dass ihr mich die wichtigen Dinge des Lebens nie habt vergessen lassen. Euer Anteil an dieser Dissertation ist von unschätzbarem Wert für mich.