



# Fehlfunktion der spinalen Astrozyten treibt den Verlust von Motoneuronen bei späten Formen der spinalen Muskelatrophie an

Linda-Isabell Schmitt<sup>1</sup> - Christina David<sup>1</sup> - Rebecca Steffen<sup>1</sup> - Stefanie Hezel<sup>1</sup> - Andreas Roos<sup>2</sup>  
- Ulrike Schara-Schmidt<sup>2</sup> - Christoph Kleinschnitz<sup>1</sup> - Markus Leo<sup>1</sup> - Tim Hagenacker<sup>1</sup>

Empfangen: 8 November 2022 / Überarbeitet: 1 März 2023 / Angenommen: 1. März 2023  
© Der/die Autor(en) 2023

## Abstrakt

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine fortschreitende neuromuskuläre Erkrankung, die durch den Verlust des Gens für das *Überleben des Motoneurons 1 (SMN1)* verursacht wird, was zu einem Verlust an spinalen Motoneuronen (MN) und damit zu Muskelschwäche und Muskelschwund führt. Die Pathogenese des MN-Verlusts bei SMA und die selektive Anfälligkeit verschiedener Zellpopulationen sind noch nicht vollständig geklärt. Um die Rolle der spinalen Astrozyten in der Pathogenese der späten SMA zu untersuchen, haben wir neben in vitro-Ansätzen auch ein Mausmodell verwendet. Es wurden Immunfärbungen, Western-Blot-Analysen, siRNA-Transfektionen (small interfering ribonucleic acid), funktionelle Assays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), Verhaltenstests und elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Eine frühe Aktivierung der spinalen Astrozyten und eine Verringerung des exzitatorischen Aminosäuretransporters 1 (EAAT1) am postnatalen Tag (P) 20 gingen dem Verlust der spinalen MNs bei SMA-Mäusen voraus, der am P42 eintrat. Die EAAT1-Reduktion führte zu erhöhten Glutamatwerten im Rückenmark von SMA-Mäusen bei P20 und P42. SMA-ähnliche Astrozyten, die mittels siRNA erzeugt wurden, und ein Ex-vivo-Modell der Glutamat-Exzitotoxizität mit organotypischen Rückenmarksschnittkulturen zeigten die kritische Rolle der Glutamat-Homöostase bei der Degeneration der MNs. Die präventive Verabreichung von Arundsäure (AA), einem Inhibitor der Astrozytenaktivierung, an SMA-Mäuse vor dem Verlust der Motoneuronen (P28) führte zu erhöhten EAAT1-Proteinspiegeln im Vergleich zu SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, und verhinderte den Anstieg von Glutamat im Rückenmark und den Verlust der MNs. Darüber hinaus bewahrte AA die motorischen Funktionen bei Verhaltensexperimenten, die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Muskelveränderungen von SMA-Mäusen. In einem translationalen Ansatz transfizierten wir gesunde menschliche Fibroblasten mit *SMN1* siRNA, was zu einer verminderten EAAT1-Expression und einer reduzierten Aufnahme, aber einer erhöhten Glutamatfreisetzung führte. Diese Ergebnisse wurden durch den Nachweis erhöhter Glutamatspiegel und verringerter EAAT1-Spiegel im Liquor von unbehandelten SMA-Patienten des Typs 2 und 3 bestätigt. Darüber hinaus war Glutamat in Serumproben erhöht, während EAAT1 nicht nachweisbar war. Unsere Daten belegen die entscheidende Rolle der spinalen Astrozyten bei der Pathogenese der spät einsetzenden SMA, die eine potenzielle treibende Kraft für den MN-Verlust durch Glutamat-Exzitotoxizität aufgrund der EAAT1-Reduktion als frühes pathophysiologisches Ereignis darstellt. Darüber hinaus stellt unsere Studie EAAT1 als potenzielles therapeutisches Ziel für zusätzliche SMN-unabhängige Therapiestrategien als Ergänzung zu SMN-verstärkenden Medikamenten vor.

**Schlüsselwörter** EAAT1 - Exzitotoxizität - Glutamat - Motoneuronenkrankheit - Arundinsäure - Neuroprotektion

## Einführung

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine fortschreitende Neuro-Muskelerkrankung, die zu Muskelschwund und -schwäche führt  
Deutschland

✉ Linda-Isabell Schmitt  
Linda-Isabell.Schmitt@UK-Essen.de

<sup>1</sup> Abteilung für Neurologie, Zentrum für Translationale Neuro- und Verhaltenswissenschaften (C-TNBS), Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen,

<sup>2</sup> Klinik für Kinderheilkunde 1, Abteilung für Neuropädiatrie, Center for Translational Neuro- and Behavioral Sciences (C-TNBS), Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen, Deutschland

SMA ist eine Erkrankung, die durch die Degeneration von Motoneuronen (MN) im ventralen Horn des Rückenmarks verursacht wird. Der SMA-Phänotyp wird anhand des Alters des Ausbruchs und des Schweregrads klassifiziert. Alle SMA-Subtypen werden durch homozygote Deletion oder kom- pund heterozygote Mutationen im Gen für das *Überleben der motorischen Neuronen (SMN) 1* verursacht, was zu einem Mangel an SMN-Protein führt [40, 42, 43, 69]. Neben *SMN1* wird das SMN-Protein durch das *SMN2*-Gen kodiert. *SMN2* unterscheidet sich von *SMN1* durch ein Cytosin zu

Thymin-Übergang im Exon 7, was zu etwa 80-90 % verkürzter mRNA und in der Folge zu einem nicht funktionsfähigen Protein führt. Die SMN2-Kopienzahl (die den SMN-Spiegel bestimmt) gilt als wichtiger Krankheitsmodifikator, da sie negativ mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [12, 39, 40].

Neben dem SMN1-Defekt sind weitere Mechanismen, die zur Pathologie der SMA beitragen, noch nicht vollständig geklärt. Die derzeitigen therapeutischen Strategien mit Nusinersen, Risdiplam oder Onasemnogene abeparvovec konzentrieren sich auf die Erhöhung des SMN-Proteinspiegels in MNs der Wirbelsäule. Diese Medikamente sind hochwirksam, wenn die Behandlung frühzeitig beginnt. Dennoch variiert die therapeutische Wirksamkeit bei symptomatischer Behandlung in Abhängigkeit vom Phänotyp und dem Alter bei Behandlungsbeginn [14, 19, 24, 46, 49-52]. Insbesondere Personen, die an spät einsetzender SMA leiden, werden erst nach langjährigem MN-Verlust behandelt; in solchen Fällen kann die Wiederherstellung der SMN allein das Fortschreiten der Erkrankung nur aufhalten oder die motorische Funktion in geringem Maße wiederherstellen. Da der Verlust der MNs in der Wirbelsäule irreversibel ist, müssen andere Ziele identifiziert werden, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die die derzeitigen SMN-verstärkenden Medikamente ergänzen.

Neben den MNs wird das SMN-Protein auch von anderen Zelltypen im gesamten ZNS exprimiert, z. B. von den spinalen Astrozyten. Astrozyten sind der häufigste neurogliale Zelltyp im ZNS und elementar für die physiologischen Funktionen von Neuronen, wie z. B. den spinalen Motoneuronen, so dass sie wahrscheinlich zur Pathologie der SMA beitragen. Die Bedeutung von Astrozyten in der Pathogenese der SMA wurde in Mausmodellen für schwere Formen der SMA nachgewiesen [1, 47]. Während die alleinige Wiederherstellung von SMN in MNs den Phänotyp der SMA-Mäuse nicht rettet, hat sich gezeigt, dass die Wiederherstellung in Astrozyten oder beiden Zelltypen den Phänotyp deutlich verbessert [58, 67].

Eine der wichtigsten Funktionen der Astrozyten ist die Regulierung und Aufrechterhaltung der extrazellulären Glutathomöostase durch die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt und den Schutz der Neuronen vor dem durch Exzitotoxizität verursachten Tod [2, 4, 18, 35, 66]. Hierfür ist die ordnungsgemäße Funktion der beiden Glutamat-Transportproteine, Excitatory Amino Acid Transporter (*SLC1A3*, EAAT) 1 und 2, in Astrozyten entscheidend. Wir haben vor kurzem den Nachweis erbracht, dass das EAAT1-Protein im Rückenmark von Mäusen mit spät einsetzender SMA und in kultivierten SMA-ähnlichen Astrozyten, die mit Hilfe von siRNA-Transfers (small interfering ribonucleic acid) erzeugt wurden, herunterreguliert ist [41], was eine Rolle für die Glutamat-

Exzitotoxizität als potenziellen Mechanismus für den MN-Verlust bei der milden Form der SMA nahelegt.

Zahlreiche Studien haben sich auf die schwereren Formen der SMA konzentriert, die eine andere und schneller fortschreitende Pathologie aufweisen als die mildere Spätform. Dennoch ist die Untersuchung der potenziellen Pathologie, die zur spät einsetzenden SMA beiträgt, notwendig, um die SMA-Pathogenese im Allgemeinen besser zu verstehen und die Unterschiede zwischen den subtypabhängigen Mechanismen zu erkennen, damit neue potenzielle therapeutische Ziele identifiziert werden können, die die derzeitigen Behandlungsstrategien ergänzen.

Die Folgen der EAAT1-Downregulation oder anderer astrozytärer Modulationen, insbesondere für die Degeneration der spinalen MNs, sind jedoch noch nicht geklärt. Ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Astrozyten und MN und ihrer Rolle in der SMA-Pathologie kann ein Schlüssel zur Identifizierung weiterer therapeutischer Ziele sein, die die derzeitigen SMN-verstärkenden Medikamente unterstützen.

Hier untersuchten wir die Rolle von EAAT1 in der Pathogenese der spät einsetzenden SMA in einem translationalen Ansatz unter Verwendung eines Mausmodells, Zellkulturen von Maus- oder induzierten menschlichen Astrozyten und Liquor- oder Serumproben von SMA-Patienten.

## Materialien und Methoden

### Tiere

SMN-defiziente Mäuse (FVB.Cg-SMN1<sup>tm1HungTg</sup>(SMN2)2Huang/J; SMA-Mäuse) wurden vom Jackson Laboratory (#005058, Bar Harbor, ME, Vereinigte Staaten) erworben. Diese Mäuse waren homozygot für das murine SMN1-Knockout und das Insert von menschlichem SMN2 (vier Kopien) und spiegeln den spät auftretenden SMA-Typ wider, der dem menschlichen SMA-Typ 2 und 3 ähnelt, jedoch mit mildereren motorischen Symptomen.

Die Mäuse wurden im Tierforschungslabor der Universitätsmedizin Essen gehalten und gezüchtet und für die Entnahme von Rückenmarksgewebe oder für in vivo Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten verwendet. Altersgleiche Wildtyp (wt) FVB/N-Mäuse dienten als Kontrolle. Es wurden beide Geschlechter verwendet (es wurde kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt). Für jedes Experiment wurden Tiere aus verschiedenen Würfen verwendet, die nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden. Die Tiere wurden in einem 12/12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, wobei Wasser und Standardfutterpellets ad libitum zur Verfügung standen. Die Tiere wurden wöchentlich beobachtet, um Körperzustand, Gewicht und allgemeinen Gesundheitszustand zu untersuchen. Wenn die Tiere an In-vivo-Experimenten teilnahmen, wurden sie täglich überwacht.

Alle Versuche wurden nach den Tierschutzrichtlinien der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Darüber hinaus wurden das verwendete SMA-Mausmodell und die In-vivo-Versuche vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) in Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 81-02.04-2020.A335; 81-02.03.2021.A078). Die Anzahl der Tiere, die für die Versuche verwendet wurden, entsprach dem 3R-Konzept.

## Vorbereitung von Rückenmarks- und Muskelschnitten

Das Rückenmarksgewebe von altersgleichen SMA- und wt-Mäusen wurde durch hydraulische Extrusion entfernt. Der lumbale Teil wurde abgetrennt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

Anschließend wurden 20-µm-Kryoschnitte angefertigt, und jeder fünfte Schnitt jedes Rückenmarks wurde auf eine

unabhängige Mikroskopie-Objektträger. Anschließend wurden die Objektträger für die Immunfärbung verwendet.

Der *Musculus tibialis anterior* wurde aus SMA- und wt-Mäusen entnommen, um Muskelabschnitte herzustellen. Die Muskeln wurden in eine TissueTek-Gewebeform gelegt, in einer Mischung aus Isopropanol und Trockeneis eingefroren und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert. Für die Immunfärbung wurden 20-µm-Kryo-Längsschnitte und für die Färbung mit Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Wasserstoff (NADH) 12-µm-Querschnitte hergestellt.

### **Kulturen von spinalen Astrozyten**

Spinale Astrozyten wurden aus wt-Mäusen isoliert, wie an anderer Stelle beschrieben [41]. Kurz gesagt wurden die Tiere mit Isofluran tief betäubt und die Wirbelsäule wurde sezert. Das gesamte Rückenmark wurde durch hydraulische Extrusion entfernt und von den Hirnhäuten befreit, um eine Kontamination der Fibroblasten zu vermeiden. Der lumbale Teil wurde abgetrennt, mit einer Rasierklinge zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 °C in eine 0,25 %ige Trypsin/EDTA-Lösung (#25200056, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gegeben. Der enzymatische Verdau wurde durch Zugabe von DMEM/F12 (#210410202, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, #16140071, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gestoppt. Danach wurde das Rückenmarksgewebe mechanisch in eine Einzelzellsuspension dissoziiert. Diese Suspension wurde mit einem Zellkulturmedium, das DMEM/F12 mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, #15140122, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) enthielt, auf 10 ml aufgefüllt, in eine 75-cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag und dann jeden zweiten Tag durch ein frisches Medium ersetzt. Wenn die Zellen 65 % Konfluenz erreicht hatten (10-14 Tage), wurden die Kolben auf einem Orbitalschüttler (250 U/min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) geschüttelt, um Mikroglia über Nacht zu entfernen. Danach wurde das Medium ersetzt. Astrozyten wurden vom Kolbenboden abgeschabt, gezählt und auf mit Poly-d-Lysin (PDL, Sigma-Aldrich, Deutschland) behandelten Glasdeckgläsern in einer 24-Well-Platte platziert (3500 Zellen pro Deckglas). Nach 7 Tagen in vitro (DIV) nach der Replikation wurden siRNA-Experimente durchgeführt.

### **Biopsieproben der menschlichen Haut**

Von allen Patienten wurde eine Einverständniserklärung eingeholt. Die Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen hat die Studie genehmigt (Genehmigungsnummer 19-9011-BO).

### **Erzeugung induzierter menschlicher Astrozyten aus Hautfibroblasten**

Induzierte Astrozyten wurden wie an anderer Stelle beschrieben erzeugt [16]. Kurz gesagt, menschliche Fibroblasten von gesunden Spendern wurden

direkt in induzierte neuronale Vorläuferzellen (iNPCs) umgewandelt, wobei retrovirale Vektoren (Oct4; Sox2; Klf4; c-Myc #RF101, ALSTEM United States) in Kombination mit neu-ralisierendem Medium verwendet wurden. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Konversionsmedium (DMEM/-F12, 1% GlutaMAX, 1% N-2-Supplement, 1% B27-Supplement, 1% P/S, 20 ng/mL humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-basic (#100-18B PreproTech, Deutschland), 20 ng/mL humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF; #AF-100-15 PreproTech, Deutschland), 5 µg/mL Heparin) gehalten und nach 5 Tagen im Verhältnis 1:2 vermehrt. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen erneut 1:2 auf Glasdeckgläser mit PDL repliziert und in iNPC-Medium (DMEM/F12, 1% GlutaMAX, 1% N-2-Supplement, 1% B27-Supplement, 1% P/S und 40 ng/ml humaner FGF-basic) plattiert. Die erzeugten iNPCs wurden mit Hilfe von Accutase abgetrennt und dann auf 24-Well-Platten mit PDL-beschichteten Glasdeckgläsern ausplattiert. Die iNPCs wurden dann mit Hilfe eines Astrozyten-Konversionsmediums (DMEM mit hohem Glukosegehalt, 10 % FBS, 1 % P/S und 0,2 % N2-Supplement) in Astrozyten differenziert und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 % kultiviert.

### **Transfektion von kultivierten spinalen Astrozyten oder induzierten menschlichen Astrozyten**

Die Transfektion von kultivierten Astrozyten zur Induktion von SMN-Defizienz wurde bei 7 DIV wie an anderer Stelle beschrieben durchgeführt [41]. Zwei Stunden vor der Applikation der siRNA (*Maus-SMN1*, #SR408287, humanes SMN1, #SR304480 OriGene, USA) auf die Zellen wurde das Kulturmedium durch FBS-freies Medium ersetzt. Danach wurden 10 nM *SMN1* siRNA mit 200 µM Silence Mag (#SM11000, OZ Bio-sciences, Frankreich) gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die kultivierten Astrozyten mit dem Komplex für 2 Stunden auf einer Magnetplatte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Schließlich wurde die Magnetplatte entfernt, und die Zellen wurden bis zum nächsten Tag bebrütet, als das siRNA-Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. Die Astrozyten wurden in der Kultur aufbewahrt, bis sie für die Experimente bei 10 DIV verwendet wurden.

### **Zerebrospinalflüssigkeits- und Serumproben von SMA-Patienten**

Liquor- und Serumproben von sieben Patienten (Alter 23-66 Jahre) mit 5q-SMA (Typ 2 oder 3) wurden analysiert. Die Proben wurden vor (Ausgangswert) und

nach einer 6-monatigen Behandlung mit dem SMN-verstärkenden Medikament Nusinersen entnommen. Liquor- und Serumproben wurden für den Glutamat-Assay oder den Enzymimmunoassay (ELISA) verwendet. Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Liquor und Serum von Nicht-SMA-Patienten dienten als Kontrolle (diagnostisches Verfahren zum Ausschluss einer ZNS-Erkrankung). Die Zustimmung zur Studie wurde erteilt von

der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen (Genehmigungsnummer 18-8285-BO).

## Immunfärbung

Lumbale Rückenmarkschnitte, spinale Astrozyten- oder induzierte humane Astrozytenkulturen wurden in 4% Paraformaldehyd (PFA; in PBS, 15 min) fixiert, gewaschen, permeabilisiert (PBS, 0,1 v/w Triton X-100, 15 min) und blockiert (PBS, 5% BSA, 1 h). Für Rückenmarkschnitte und Astrozytenkulturen wurden primäre Antikörper für SMN (Anti-Kaninchen, 1:200, #NBP2-763839, Novus Biologicals, Deutschland), schweres Neurofilament-Polypeptid (SMI-32, Anti-Maus, 1:500, #801701, Biolegend, USA), glial fibrillary acid protein (GFAP) (Anti-Maus, 1:500, #63893, Sigma-Aldrich, Deutschland) oder EAAT1

(Anti-Kaninchen, 1:500, #250113, Synaptic Systems, Deutschland) wurden in Blocking-Lösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit sekundären Antikörpern (Ziegen-Anti-Maus Cy3 1:300 oder Ziegen-Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488, Dianova, Deutschland) und Dapi zur Gegenfärbung der Kern-DNA in Blockierlösung für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 Apotome Fluoreszenzmikroskop und der Zeiss Zen Software aufgenommen. Alle Mikroskopeinstellungen, wie Laserintensität, Belichtungszeit oder Kontrast, wurden für jedes zu analysierende Protein konstant gehalten.

Die Software Image J (NIH) wurde zur Messung der Immunreaktivität verwendet. Daher wurden immunreaktivitäts-positive Zellen mit dem Freihandwerkzeug ausgewählt. Die Fluoreszenzintensität jedes Proteins wurde gemessen und gegen den Hintergrundbereich in jedem Bild normalisiert. Darüber hinaus wurden die Werte der Fluoreszenzintensität im SMA-Mausgewebe auf das Kontrollgewebe mit normalem Körpergewicht normiert.

Die Anzahl der motorischen Neuronen in den lumbalen ventralen Hörnern der Rückenmarkschnitte von SMA-Mäusen wurde durch Zählen der SMI-32-positiven Zellen berechnet und mit der Anzahl in Kontrollmäusen verglichen. Es wurden nur SMI-32-positive MNs mit sichtbaren Zellkernen gezählt. Es wurden drei Schnitte pro Tier analysiert.

## Färbung der neuromuskulären Verbindungsstelle (NMJ)

Die Schnitte des *M. tibialis anterior* wurden mit dem primären Antikörper für präsynaptisches Synaptophysin (Anti-Kaninchen, 1:500, #101,203, Synaptic Systems, Deutschland) wie oben beschrieben inkubiert. Danach wurden die Schnitte gewaschen und mit einem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Cy3, 1:300,

Dianova, Deutschland) in einer Blockierlösung für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Postsynapse wurde zusätzlich mit  $\alpha$ -Bungarotoxin Alexa Fluor gefärbt.

488 ( $\alpha$ -BTX, 1:500, #B13422, Thermo Fisher Scientific, Deutschland).

Die NMJ wurden mit der Software Image J analysiert. Die NMJ-Größe wurde mit der Image J-Software ausgewertet. Die Immunreaktivität von präsynaptischem Synaptophysin wurde wie oben beschrieben gemessen. Die Ko-Lokalisierung von präsynaptischem Synaptophysin und postsynaptischem  $\alpha$ -BTX wurde mit dem Ko-Lokalisierungstool analysiert.

### **NADH-Färbung von *M. tibialis anterior***

Querschnitte des *M. tibialis anterior* wurden in NADH-Tetrazolium-Lösung (NADH, #N8129, Sigma Aldrich, Deutschland; Nitroblau-Tetrazolium, #N6876, Sigma Aldrich, Deutschland) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die ungebundene Lösung wurde durch aufeinanderfolgendes Waschen mit 30% Aceton, 60% Aceton, 90% Aceton, 60% Aceton und 30% Aceton entfernt und mit Immumount aufgezoogen. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axio Observer.Z1 Apotome Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Intensität der NADH-Färbung und die Querschnittsfläche wurden in der Software Image J analysiert, indem jede Muskelfaser ausgewählt und die integrierte Intensität und Fläche aufgezeichnet wurde. Darüber hinaus wurde die Anzahl von Typ 1 (dunkel) und 2 (hell) gezählt.

### **Western-Blot-Analyse**

Wir führten eine Western-Blot-Analyse durch, um den ermittelten Proteingehalt durch Immunfärbung zu bestätigen. Dazu wurde das Rückenmarksgewebe von SMA- oder wt-Mäusen oder Zellkulturen in RIPA-Puffer mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Deutschland) homogenisiert. Die Proteinmenge in diesen Lysaten wurde mit einem Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assay bestimmt.

Zehn Mikrogramm Protein wurden auf 4-15%ige TGX Stain-Free-Gele (Biorad, Deutschland) aufgetragen, und die Proteine wurden mit einem Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf 0,2  $\mu$ m Nitrocellulose-Membranen übertragen. Für die Auswertung der Gesamtproteine wurden Bilder der Membranen angefertigt. Anschließend wurden die Membranen in Fast-Blocking-Lösung (Biorad, Deutschland) unter leichtem Schütteln für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit primären Antikörpern (in Blockierlösung) gegen SMN (Anti-Kaninchen, 1:10.000, #NBP2-763839, Novus Biologicals, Deutschland), GFAP (Anti-Maus, 1:5000, #63893, Sigma-Aldrich, Deutschland) oder EAAT1 (Anti-Kaninchen, 1:5000, #250113, Synaptic Systems, Deutschland) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ein primärer Antikörper gegen  $\beta$ -



Nach dem Waschen wurden die Membranen mit an Meerrettichperoxidase gekoppelten Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-Antikörpern für 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Die Immunreaktivität wurde mit einem verstärkten Chemilumineszenzsubstrat und einem Western-Blot-Imaging-System (Biorad, Deutschland) nachgewiesen.

Die Analyse der Western-Blot-Signale wurde mit der Biorad Imaging Software durchgeführt. Zunächst wurde das Signal der einzelnen Protein- und Aktinspuren gemessen. Dann wurde das Proteinsignal jeder Spur auf den Gesamtproteinwert normiert. Schließlich wurde der berechnete Proteingehalt von SMN-Mäusen weiter auf den Wert normiert, der in altersgleichen wt-Mäusen ermittelt wurde.

Zum Nachweis verschiedener Proteine auf derselben Membran wurden diese, wie oben beschrieben, abgestreift, blockiert und mit Antikörpern inkubiert.

Alle Western Blots und Gesamtproteinfärbungen, die für die Mittelwertberechnungen verwendet wurden, sind im ergänzenden Material enthalten (ergänzendes Material: Abb. 1-6, Online-Ressource).

### **Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) und Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Die Gesamt-RNA wurde mit Qiazol (Qiagen #79306) aus Rückenmarksproben oder Zellkulturen extrahiert. Ein Mikrogramm jeder RNA-Probe wurde für die Erststrang-Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) in einer 20- $\mu$ l-Reaktion mit einem hochleistungsfähigen cDNA-RT-Kit (Applied Biosystems #4368814) verwendet. Die Expressionswerte von EAAT1 (vorwärts GCG ATTGGTCGCGGTGATAATG, rückwärts CGACAATGACTG

TCACGGTGTAC; #MP215637, OriGene, Vereinigte Staaten) wurden durch eine Echtzeit-qPCR-Analyse unter Verwendung des Power SYBR™ Green PCR Master Mix (#4,367,659, Applied Biosystems, Vereinigte Staaten) quantifiziert. Die Daten wurden auf das Hauskeeping-Gen  $\beta$ -Actin normalisiert (vorwärts CATTGCTGACAG GATGCAGAAGG, rückwärts TGCTGGAAGGTGGACAGT GAGG; # MP200232, OriGene, Vereinigte Staaten).

### **Ex-vivo-Modell der Glutamat-Exzitotoxizität**

Organotypische Rückenmarksnchnittkulturen (OTSCs) wurden von wt-Mäusen präpariert. Die Rückenmarkscheiben wurden mit einem Vibratom (Leica, Deutschland) in 350  $\mu$ m große Stücke geschnitten und auf Membraneinsätze (0,4  $\mu$ m Porengröße, Sarstedt, Deutschland) in 6-Well-Platten mit 1 ml Kulturmedium (Neurobasal A, 1% P/S, 1:50 B27) gelegt. Nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden wurden die Scheiben 1 Stunde lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Glutamat (50 oder

500  $\mu$ M) oder 0,9 %iger Kochsalzlösung (Kontrolle) behandelt. Danach wurde das Medium durch ein glutamatfreies Medium ersetzt und die Schnitte wurden weitere 48 Stunden bebrütet. Alternativ wurden die Rückenmarksschnitte 48 Stunden lang mit PDC (100 oder 200  $\mu$ M) oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Kontrolle) behandelt.

Schließlich wurden die OTSCs fixiert und für SMI-32 als Marker für spinale MNs angefärbt. Die Anzahl der MNs im ventralen Horn wurde gezählt und zwischen den beiden Bedingungen wie oben beschrieben verglichen. Darüber hinaus wurden Schnitte und Überstände für den Glutamat-Assay verwendet.

Gewebeentnahme geopfert. Die Experimentatoren waren für die Behandlung, die Verhaltenstests, die Immunfärbung und die Analyse verblindet.

## Glutamat-Assay

Der Glutamat Spiegel im Rückenmarksgewebe von wt- und SMA-Mäusen wurde durch Herstellung eines Gewebelysats zu verschiedenen Zeitpunkten der SMA-Pathologie gemessen. Das Gewebe von altersgleichen wt-Mäusen diente als Kontrolle.

Zur Messung der Glutamataufnahme in kultivierten SMN-defizienten spinalen Astrozyten oder induzierten humanen Astrozyten, wt-Astrozyten oder wt-Astrozyten, die mit dem EAAT-Inhibitor L-trans-Pyrrolidin-2,4-dicarbonsäure (PDC, Tocris, UK) inkubiert wurden, wurde den kultivierten Zellen bei 10 DIV 200  $\mu$ M Glutamat zugeführt. Nach 4 Stunden Glutamat-Exposition wurde das astrozytenkonditionierte Medium gesammelt.

Gemäß dem Herstellerprotokoll wurde der Glutamatgehalt des gesammelten astrozytenkonditionierten Mediums, des Kulturüberstands, des Rückenmarksgewebelysats oder des menschlichen Liquors sowie der Serumproben mit einem Glutamat-Assay-Kit (#MAK004, Sigma Aldrich, USA) bestimmt. Die Gesamtproteinmenge in jeder Probe wurde mit einem BCA-Protein-Assay bestimmt. Anschließend wurde die gemessene Glutamatmenge auf die Gesamtproteinmenge der entsprechenden Probe normiert. Die berechneten Werte für die SMN-Proben wurden auf die entsprechenden Kontrollen normiert.

## ELISA

Um den EAAT1-Spiegel in Liquor- oder Serumproben von SMA-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen, wurde ein ELISA-Test gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt (#MBS070849, MyBioSource, USA).

## In-vivo-Behandlung von SMA- und wt-Mäusen

Arundsäure (AA; 4 mg/kg KG; Caymanchem, USA) wurde in PBS + 0,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, Deutschland) verdünnt und täglich als intraperitoneale (i.p.) Injektion verabreicht. Die Mäuse wurden von P25 bis P44 entweder mit AA oder dem Vehikel (PBS + 0,5% DMSO) behandelt. Das motorische Verhalten der Mäuse wurde bei P33 und P44 getestet. Schließlich wurden die Tiere bei P44 zur

## Motorische Verhaltenstests

### Griffstärke

Zur Messung der Greifkraft der Hintergliedmaßen wurde ein Greifkraftmesser (Ugo Basil, Italien) verwendet. Kurz gesagt, das Tier wurde auf ein abgewinkeltes Netz gestellt, das vom Messgerät abgewandt war. Der Schwanz wurde parallel zum Netz in Richtung des Messgeräts gezogen, bis die Hinterbeine losgelassen wurden. Drei Kraftmessungen wurden nacheinander (innerhalb von 2 Minuten) durchgeführt. Schließlich wurde der Mittelwert aller Versuche berechnet.

### Rotarod

Um die motorische Koordination und das Gleichgewicht zu beurteilen, wurde die Rotarod-Laufzeit aufgezeichnet. Die Mäuse wurden auf einen Rotarod mit einer Startgeschwindigkeit von vier Umdrehungen pro Minute (U/min) und einer Beschleunigungsrate von 40 U/min gesetzt, mit einer maximalen Abschaltzeit von 300 s. Drei Läufe pro Tier wurden aufgezeichnet, und der Mittelwert wurde berechnet.

### Nervenleitfähigkeitsstudien (NCS)

Aufzeichnungen des zusammengesetzten Muskelaktionspotenzials (CMAP) wurden verwendet, um Veränderungen in der motorischen Nervenleitung festzustellen. Die Tiere wurden durch Inhalation von Isofluran/O<sub>2</sub> betäubt (zur Einleitung der Narkose 5%, zur Aufrechterhaltung 2% Isofluran in 100% Sauerstoff). Nach dem Verlust der messbaren Schmerzreflexe wurde der Ischiasnerv zunächst an der Ischiaskerbe mit Mikronadelelektroden stimuliert, bevor er am Knöchel stimuliert wurde. Schließlich wurde die Referenzelektrode im Nacken platziert. Es wurde jeweils ein einzelner Impuls mit 5 Hz für 0,1 ms abgegeben. Die subtrahierte Latenzzeit der beiden Messungen sowie die Amplitude wurden aufgezeichnet.

### Statistische Analyse

Die Versuchsergebnisse wurden mit der Software Graph Pad Prism 9.4.1 statistisch ausgewertet. Zunächst wurden alle Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurden die Daten je nach Experiment mit dem Student's t-Test (Welch's t-Test; zwei Gruppen; normal verteilt), dem Mann-Whitney U-Test (zwei Gruppen; nicht normal verteilt), der gewöhnlichen einseitigen ANOVA mit Holm-Sidak-Mehrfachvergleichstest (drei Gruppen; normal verteilt) oder dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-

**Abb. 1** SMA-Mäuse im Spätstadium zeigen phänotypische Veränderungen, verminderte Körpergewichte und SMN-Proteinspiegel. **a** SMA-Mäuse zeigten eine verminderte Greifkraft bei P33 ( $p < 0,05$ ) und P44 ( $p < 0,05$ ). **b** Das Körpergewicht von SMA-Mäusen war bei P20 und P42 im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße reduziert ( $p < 0,001$ ). **c** Fotos von Mäusen mit normaler Körpergröße und SMA-Mäusen bei P42 zeigen nekrotisches Schwanzgewebe unter SMA-Bedingungen bei P42. Bei P15 wurde kein Unterschied festgestellt ( $p > 0,05$ ). **d** Immunfärbung von SMN (grün) im ventralen Horn von lumbalen Rückenmarkscheiben von wt- oder SMN-Mäusen bei P15, P20 und P42. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Der relative SMN-Spiegel im ventralen Horn von SMA-Mäusen war zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu wt-Mäusen reduziert ( $p < 0,001$ ). **e** Western-Blot-Analyse des SMN-Proteinspiegels im Rückenmarksgewebe von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42. Beta-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Analyse ergab, dass die SMN-Proteinkonzentrationen in SMA-Mäusen zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu wt-Kontrollmäusen reduziert waren ( $p < 0,01$  bis  $p < 0,001$ ).  $n = 6$  Tiere pro Bedingung für die Immunfärbung. Es wurden drei Schnitte pro Lumbalband des Rückenmarks untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von drei Rückenmarkscheiben pro Tier.  $n = 3$  Tiere pro Bedingung für die Western-Blot-Analyse.  $n = 12$  Tiere pro Bedingung für die Körpergewichtsanalyse. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Abkürzungen: P, postnataler Tag; SMA, spinale Muskelatrophie; SMN, Überleben von Motoneuronen; wt, Wildtyp. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

verglichen mit gleichaltrigen wt-Mäusen (Abb. 1c).

Bei der Immunfärbung und Western-Blot-Analyse von lumbalem Rückenmarksgewebe wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten (P15, P20, P42:  $p < 0,0001$ ; Abb. 1d) ein niedrigerer SMN-Proteinspiegel festgestellt (P15:  $p = 0,078$ ; P20:  $p = 0,063$ ; P42:  $p = 0,0001$ ; Abb. 1e) (Ergänzende Abb. 1, Online-Ressource).

SMA-Gewebe oder SMA-ähnliche Zellen wurden immer zu bestimmten Zeitpunkten mit altersgleichem Gewebe oder Kontrollzellen verglichen. Der für jedes Experiment verwendete Test ist im Zusatzmaterial zu finden (Zusatzmaterial, Tabelle 1, Online-Ressourcen).

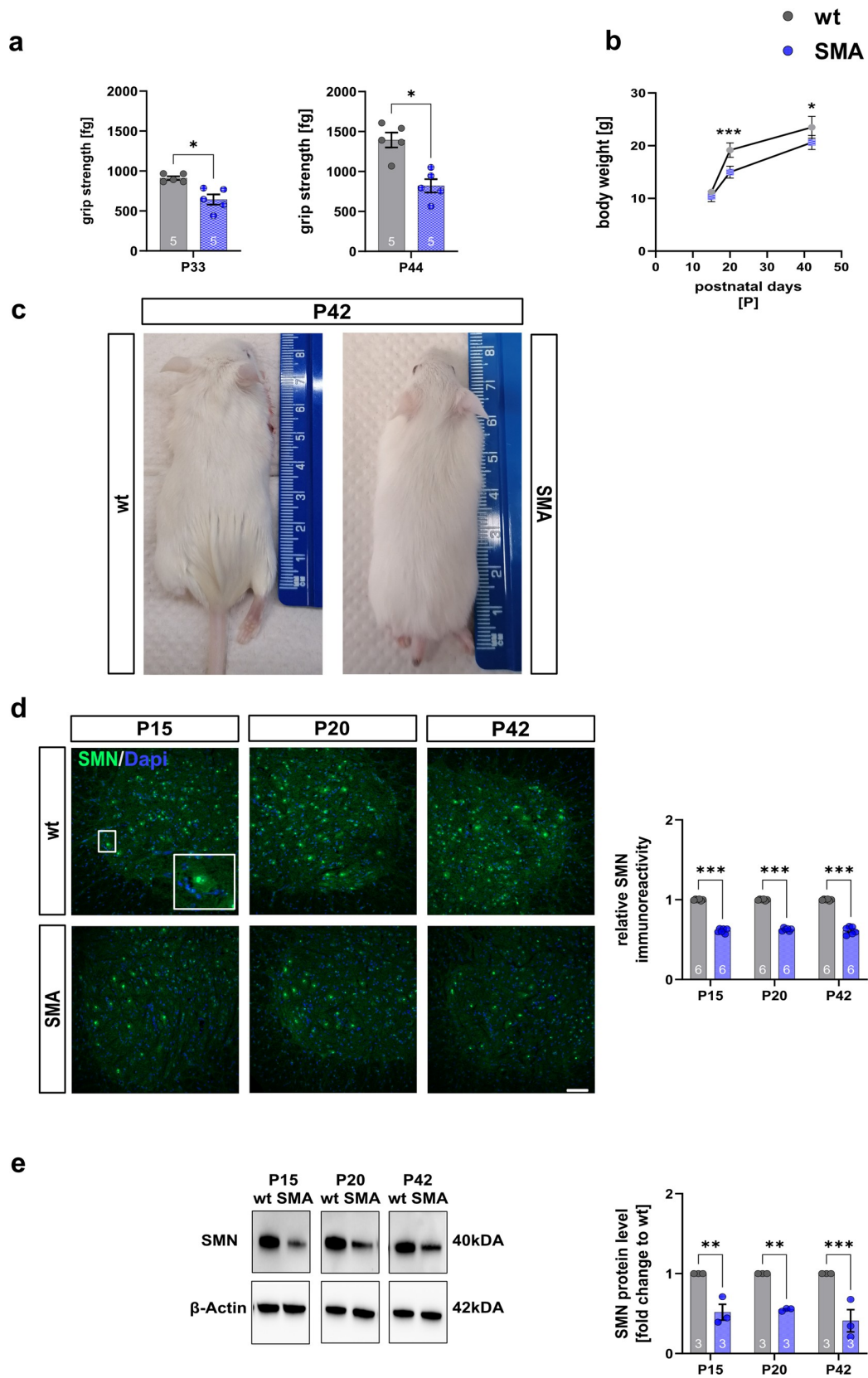
Die Signifikanzniveaus wurden anhand des p-Wertes definiert (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  oder \*\*\* $p < 0,001$ ). Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

## Ergebnisse

### Mausmodell für spät einsetzende SMA spiegelt langsames Fortschreiten der Krankheit bei leicht betroffenen SMA-Patienten wider

SMA-Mäuse mit spätem Auftreten zeigten im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße eine verminderte Griffkraft als Zeichen einer leichten Parese der Hintergliedmaßen bei P33 ( $p = 0,031$ ) und P44 ( $p = 0,028$ ) (Abb. 1a).

Darüber hinaus wiesen SMA-Mäuse bei P20 ( $p = 0,0007$ ) und P42 ( $p = 0,032$ ) ein geringeres Körpergewicht auf (Abb. 1b). Bei SMA-Mäusen im Spätstadium wurden während ihrer Entwicklung phänotypische Veränderungen beobachtet. Die Tiere zeigten Anzeichen von Schwanznekrosen, die zu Gewebeverlust und kürzeren Schwänzen führten,



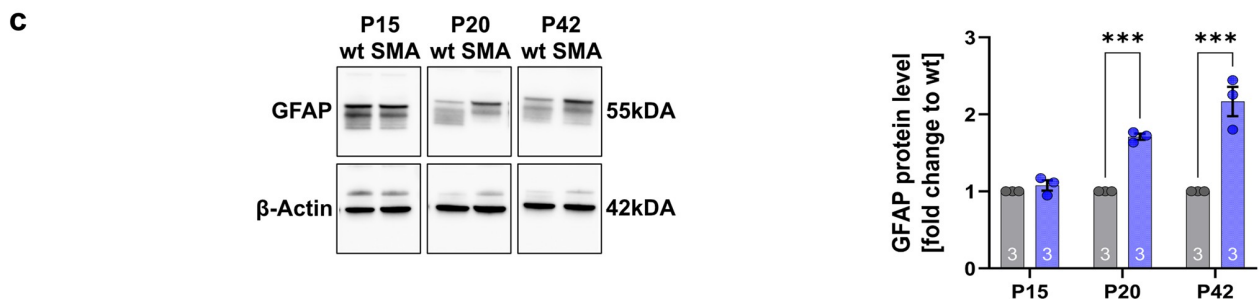
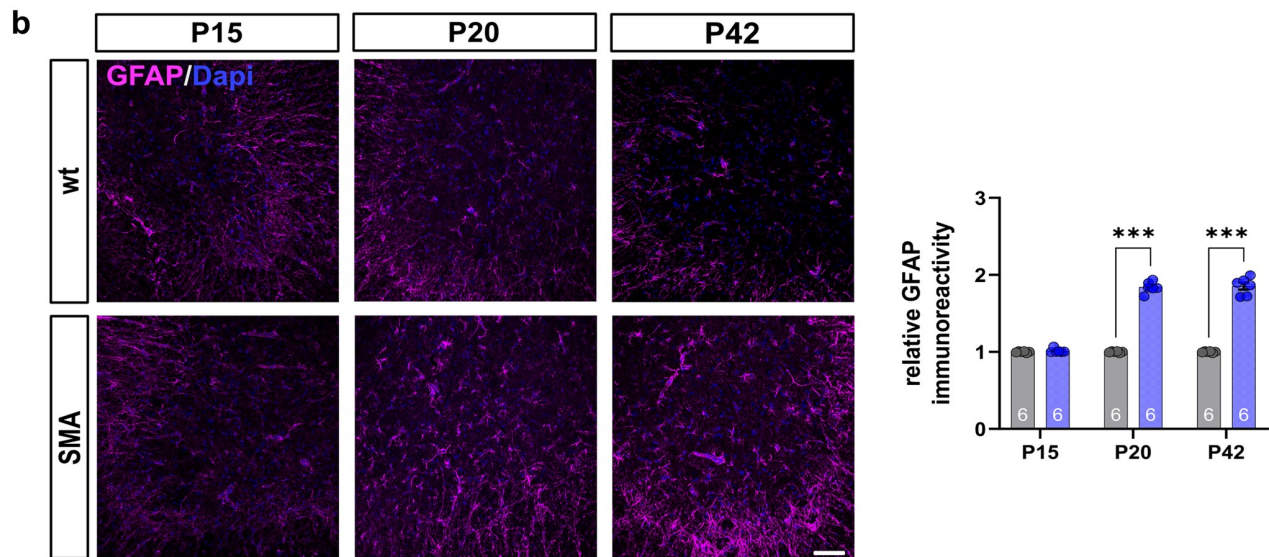
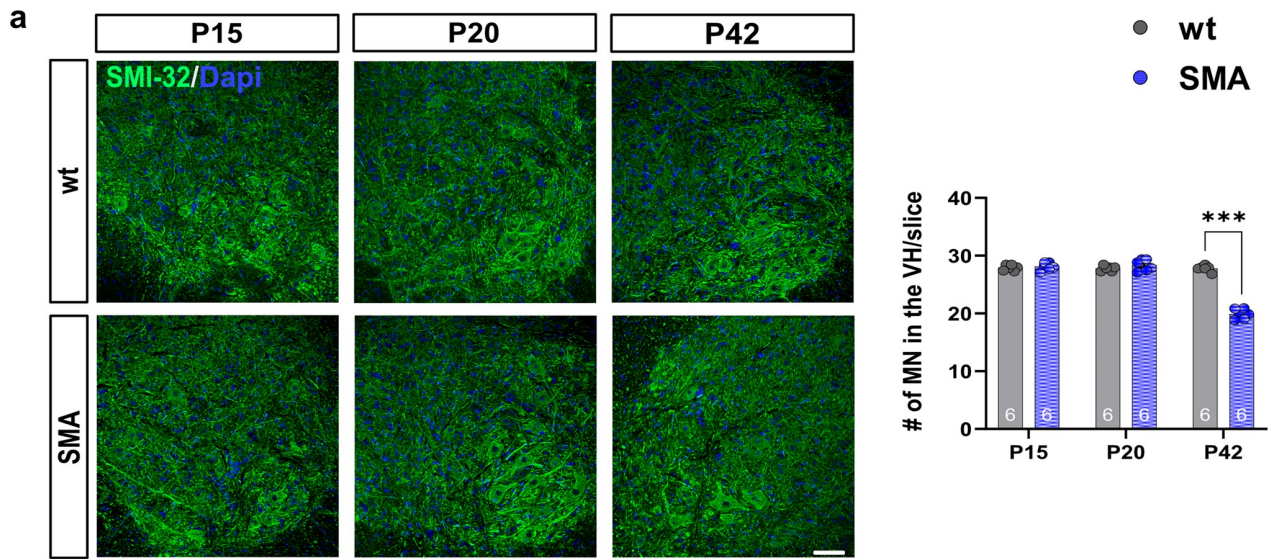




Abb. 2: Die Aktivierung der spinalen Astrozyten geht dem Verlust der spinalen MN voraus. **a** Immunfärbung der spinalen MN (SMI-32, grün) im Venenhorn der lumbalen Rückenmarkscheiben von Mäusen mit und ohne SMA bei

P15, P20, und P42. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Die Anzahl der spinalen MNs in SMA-Mäusen war bei P42 reduziert ( $p < 0,001$ ). **b** Immunfärbung von GFAP (magenta) als Marker der Astrozytenreaktivität im ventralen Horn von lumbalen Rückenmarkscheiben von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. SMA-Mäuse zeigten einen erhöhten relativen GFAP-Proteinspiegel bei P20, vor dem MN-Verlust, und P42 im Vergleich zu wt-Mäusen ( $p < 0,001$ ). **c** Western-Blot-Analyse des GFAP-Proteinspiegels im Rückenmarksgewebe von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42. Beta-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. SMA-Mäuse zeigten bei P20 und P42 einen erhöhten GFAP-Proteinspiegel im Vergleich zu wt-Mäusen ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$  Tiere pro Bedingung für Immunfärbung. Drei Schnitte pro lumbales Rückenmark wurden untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von drei Rückenmarkscheiben pro Tier.  $n = 3$  Tiere pro Bedingung für die Western-Blot-Analyse. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Abkürzungen: GFAP, glial fibrillary acid protein; MN, motor neuron; P, postnataler Tag; SMA, spinale Muskelatrophie; wt, Wildtyp; #, Anzahl. P-Werte: \* $p < 0,05$ ,

\*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

### Erhöhte Reaktivität von Astrozyten geht dem Verlust von MNs im Rückenmark voraus

Die Immunfärbung für den MN-Marker SMI-32 zeigte den ersten Verlust von spinalen MNs bei SMA-Mäusen bei P42 ( $p < 0,001$ ), während bei P15 oder P20 keine Veränderung beobachtet wurde (P15:  $p = 0,522$ ; P20:  $p = 0,233$ ) (Abb. 2a. Ergänzende Abb. 7, Online-Ressource). Immunfärbung und Western-Blot-Analyse für GFAP zeigten eine astrozytäre Reaktivität durch erhöhte GFAP-Proteinspiegel als Marker für die Aktivierung von spinalen Astrozyten in SMA-Mäusen bei P20 ( $p < 0,0001$ ) vor dem Verlust der spinalen MNs und bei P42 (Abb. 2b, c. Ergänzende Abb. 2, Online-Ressource).

### Verminderung von EAAT1 und erhöhter Glutamatspiegel als treibende Kraft für MN-Verlust

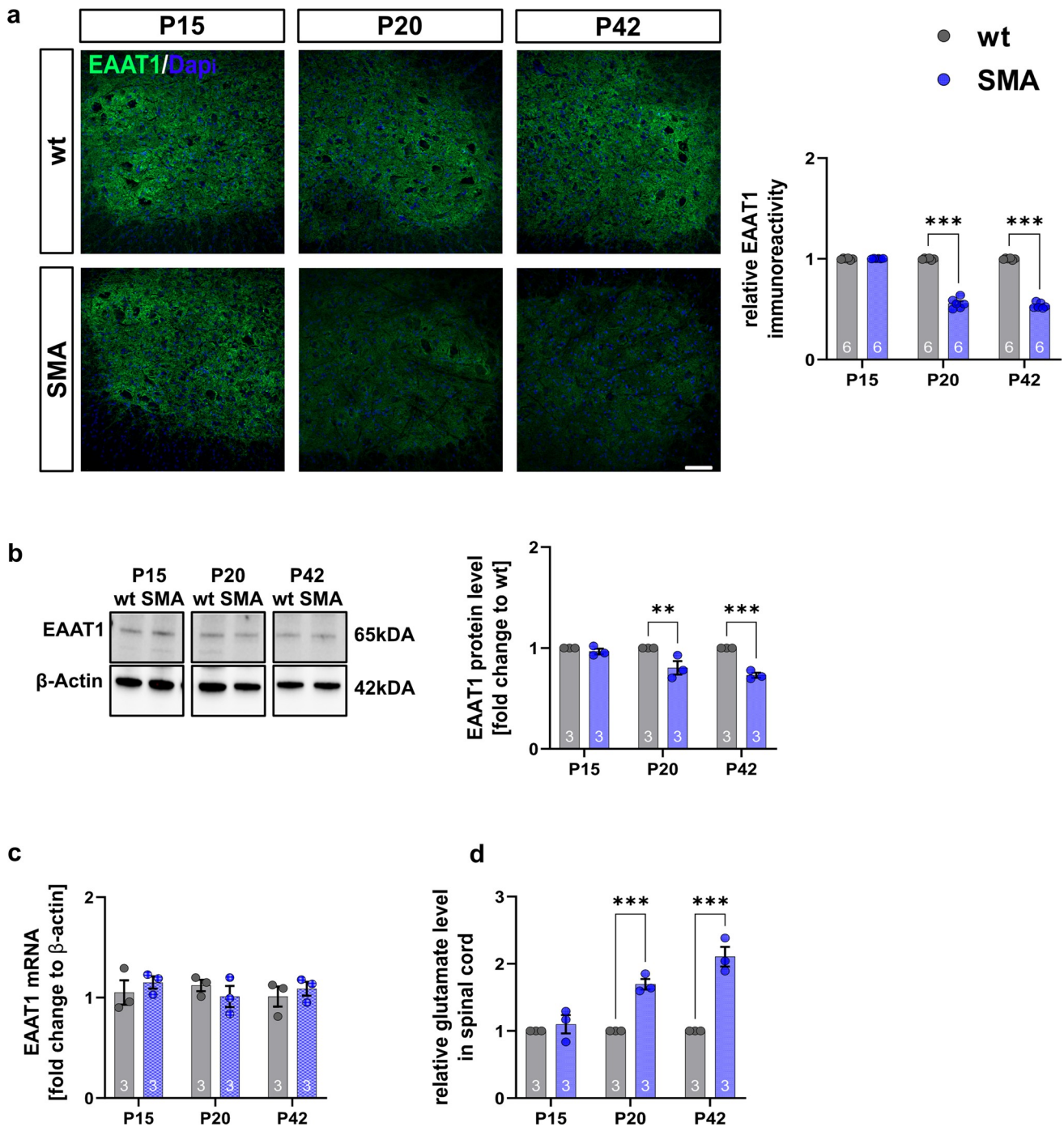
Die EAAT1-Proteinspiegel waren bei SMA-Mäusen ab P20 reduziert (P20:  $p = 0,0009$ ; P42:  $p < 0,0001$ , Abb. 3a; P20:  $p = 0,003$ ;

P42:  $p = 0,0005$ , Abb. 3b) (Ergänzende Abb. 3, Online-Ressource). Im Gegensatz dazu waren die EAAT1-mRNA-Spiegel in SMA-Mäusen nicht verändert ( $p > 0,05$ ) (Abb. 3c). Die Glutamatspiegel waren bei P20 ( $p < 0,001$ ) und P42 ( $p < 0,001$ ) erhöht (Abb. 3d), was eine Korrelation zwischen der Verringerung des EAAT1-Proteins und den erhöhten Glutamatspiegeln zeigt.

Um einen SMN-Mangel zu induzieren und SMA-ähnliche Zellen zu erzeugen, wurden kultivierte spinale Astrozyten oder kultivierte induzierte humane Astrozyten mit scrambled (Kontrolle) oder *SMN1* siRNA mittels magnetischer Transfektion transfiziert. In den mit *SMN1* siRNA transfizierten kultivierten wt spinalen Astrozyten (SMA-ähnliche Astrozyten) wurde durch Immunfärbung eine Verringerung des SMN-Proteinspiegels festgestellt ( $p = 0,002$ ) (Abb. 4a). Immunfärbung und Western-Blot-Analyse zeigten eine Verringerung des EAAT1-Proteinspiegels ( $p < 0,002$ , Abb. 4c;  $p < 0,0022$ , Abb. 4d) (Zusatzabbildung 6, Online-Ressource) in SMA-ähnlichen Astrozyten. Es wurde keine Veränderung des EAAT1 mRNA-Spiegels ( $p > 0,999$ ) festgestellt (Abb. 4e). Wie in den Slice-Kulturen waren die GFAP-Spiegel in SMN-defizienten Astrozyten erhöht ( $p = 0,002$ ) (Abb. 4b).

Zur Messung der Glutamataufnahme wurden SMA-ähnliche Astrozyten oder mit scrambled siRNA transfizierte Kontrollzellen, Astrozyten 4 Stunden lang 200  $\mu\text{M}$  Glutamat ausgesetzt und der Glutamatspiegel im Überstand wurde gemessen. In SMA-ähnlichen Astrozyten war die Glutamataufnahme reduziert ( $p < 0,001$ ).

Die Modulation der Glutamataufnahme in kultivierten wt-Astrozyten der Wirbelsäule mit PDC als EAAT1-Inhibitor reduzierte die Glutamataufnahme aus dem Medium ( $p < 0,0001$ ), was auf die Bedeutung von EAAT1 für die Glutathomöostase hinweist (Abb. 4f). Auch ohne Glutamat-Exposition waren die Glutamatspiegel im Überstand von SMA-ähnlichen Astrozyten im Vergleich zu mit Scrambled siRNA transfizierten Kontrollzellen erhöht, was die Freisetzung dieses Transmitters astrozytären Ursprungs belegt. ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 4g).



**Abb. 3** SMA-Mäuse mit spätem Beginn zeigen früh eine verminderte EAAT1-Expression und erhöhte Glutamat Spiegel. **a** Immunfärbung von EAAT1 (grün) im ventralen Horn von lumbalen Rückenmarkscheiben von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Der relative EAAT1-Proteinspiegel im ventralen Horn von SMA-Mäusen war bei P20, vor dem Verlust der Motoneuronen, und bei P42 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu wt-Mäusen reduziert. **b** Western-Blot-Analyse des EAAT1-Proteinspiegels im Rückenmarksgewebe von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42. Beta-Actin wurde als Ladekontrolle

verwendet. SMA-Mäuse zeigten bei P20 ( $p < 0,01$ ) und P42 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu wt-Mäusen einen reduzierten EAAT1-Proteinspiegel. **c** Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Veränderung der EAAT1-mRNA-Expression beobachtet ( $p > 0,05$ ). **d** Messung der Glutamat



Spiegel im Rückenmark von wt- oder SMA-Mäusen bei P15, P20 und P42 mit einem Glutamat-Assay-Kit. Der Glutamatspiegel im Rückenmark von SMA-Mäusen war bei P20 ( $p < 0,001$ ) und P42 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu wt-Mäusen erhöht.  $n = 6$  Tiere pro Bedingung für Immunfärbung. Drei Schnitte pro lumbales Rückenmark wurden untersucht. Jeder Datenpunkt spiegelt den Mittelwert von drei Rückenmarkscheiben pro Tier wider.  $n = 3$  Tiere pro Bedingung für Western-Blot-Analyse, qPCR-Analyse und Glutamatmessungen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Abkürzungen: EAAT1, exzitatorischer Aminosäuretransporter 1; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure; P, postnataler Tag; qPCR, Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; SMA, Spinale Muskelatrophie; wt, Wildtyp. P-Werte: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

### Absterben spinaler MNs in einem Ex-vivo-Modell der Glutamat-Exzitotoxizität

Der Einfluss von Glutamat auf das Überleben der spinalen MNs wurde mit Rückenmarksschnittkulturen von wt-Mäusen bestimmt. Achtundvierzig Stunden nach einer Glutamat-Exposition von entweder 50 oder 500  $\mu\text{M}$  für 30 Minuten war die Anzahl der spinalen MNs in den Rückenmarksschnitten reduziert ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 5a). Die Exposition der Rückenmarksschnittkulturen gegenüber PDC (100 oder 200  $\mu\text{M}$ ) für 48 h reduzierte die Anzahl der spinalen MNs ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 5b). Die Aufnahme von Glutamat in PDC-behandelten Kulturen war reduziert, was zu erhöhten Glutamatspiegeln im Gewebe führte (100  $\mu\text{M}$  PDC:  $p = 0,006$ ; 200  $\mu\text{M}$  PDC:  $p = 0,007$ )

und Überstand ( $p < 0,0001$ ), was auf eine gestörte Glutamataufnahme als treibende Kraft für die Degeneration der spinalen MNs hindeutet (Abb. 5c, d).

### Hochregulierung von EAAT1 in SMA-Mäusen verhindert den Verlust von Motoneuronen

Um die Bedeutung der EAAT1-Dysfunktion für die Pathogenese der spät einsetzenden SMA zu untersuchen, wurden SMA- und wt-Mäuse mit AA behandelt, einem Lipid, von dem bekannt ist, dass es die Aktivierung von Astrozyten hemmt und die Expression des EAAT1-Proteins erhöht [36]. SMA-Mäusen wurde wiederholt AA oder ein Vehikel durch i.p.-Injektionen verabreicht.

Die Verabreichung von AA bei P28, als EAAT1 reduziert war, aber vor dem Verlust von MN, verhinderte die astrozytäre Aktivierung (gemessen durch GFAP) bei SMA-Mäusen bei P44 ( $p < 0,0001$ , Abb. 6a; SMA veh vs. wt veh:  $p = 0,006$ ; SMA veh vs. SMA AA:  $p = 0,003$ , Abb. 6b) (Ergänzende Abb. 4, Online-Ressource).

Bei SMA-Mäusen, die mit AA behandelt wurden, waren die EAAT1-Protein- und mRNA-Spiegel im Vergleich zu SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, hochreguliert ( $p < 0,0001$ , Abb. 6c;  $p < 0,001$ , Abb. 6d;  $p = 0,023$ ,

Abb. 6e) (ergänzende Abb. 5, Online-Ressource) mit einer Verringerung der Glutamatspiegel ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 6f), während der Verlust von MNs in SMA-Mäusen verhindert wurde ( $p = 0,001$ ) (Abb. 6g. Ergänzende Abb. 8, Online-Ressource).

Eine direkte Auswirkung von AA auf den SMN-Spiegel wurde im Vergleich zu SMA-Mäusen, die mit einem Vehikel behandelt wurden, nicht festgestellt ( $p > 0,999$ ),

was darauf hindeutet, dass diese Effekte SMN-unabhängig waren (Abb. 7a und b. Ergänzende Abb. 4, Online-Ressource).

## Motorische Funktionen und elektrophysiologische Eigenschaften von SMA-Mäusen wurden durch AA erhalten

Die Behandlung von SMA-Mäusen mit AA erhöhte die Laufdauer auf dem Rotarod im Vergleich zu mit dem Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen bei P33 ( $p = 0,012$ ) und P44 ( $p < 0,0001$ ). Mit dem Vehikel behandelte SMA-Mäuse zeigten bei P33 ( $p = 0,005$ ) und P44 ( $p < 0,0001$ ) eine verkürzte Laufdauer auf dem Rotarod im Vergleich zu Mäusen ohne Körpergewicht (Abb. 7c). Die Greifkraft war bei AA-behandelten SMA-Mäusen im Vergleich zu Vehikel-behandelten SMA-Mäusen bei P33 ( $p = 0,007$ ) und P44 ( $p = 0,012$ ) erhöht. Im Gegensatz dazu hatten mit dem Vehikel behandelte SMA-Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße eine geringere Griffkraft (P33:  $p = 0,012$ ; P44:  $p = 0,024$ ) (Abb. 7d).

Die Amplitude des motorischen Potenzials (MPA) war bei AA-behandelten SMA-Mäusen im Vergleich zu Vehikel-behandelten SMA-Mäusen bei P44 erhöht ( $p = 0,015$ ), während Vehikel-behandelte SMA-Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen eine reduzierte MPA aufwiesen ( $p = 0,01$ ). Bei P33 wurde kein Unterschied zwischen AA-behandelten SMA-Mäusen und Vehikel-behandelten wt-Mäusen beobachtet ( $p > 0,335$ ) (Abb. 7e).

Bei P33 wurde keine Veränderung der motorischen Leitungsgeschwindigkeit (MCV) zwischen den verglichenen Gruppen gemessen ( $p > 0,55$ ), während die MCV bei den mit Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen bei P44 leicht reduziert war ( $p = 0,002$ ) (Abb. 7f).

AA hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht oder das Fortschreiten der Schwanznekrose (Abb. 7g, h).

## Die Anzahl der Muskelfasern und die Strukturen der NMJ in SMA-Mäusen blieben durch AA

Zur Analyse der Muskelfaseranzahl nach AA-Behandlung wurde eine NADH-Färbung von *M. tibialis anterior* Scheiben bei P44 durchgeführt. Wenn SMA-Mäuse mit AA behandelt wurden, war die Intensität der Färbung im Vergleich zu SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, erhöht ( $p = 0,005$ ;  $p = 0,003$ ). Es

wurde kein Unterschied zu wt-Mäusen beobachtet ( $p = 0,681$ ) (Abb. 8a). Während bei SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, die Anzahl der Muskelfasern reduziert war ( $p = 0,006$ ), waren die Muskelfasern bei AA-behandelten SMA-Mäusen nicht betroffen ( $p = 0,272$ ) (Abb. 8b). Bei SMA-Mäusen, die mit Vehikel behandelt wurden, war die Anzahl der lichtgefärbten Typ-2-Fasern reduziert ( $p = 0,042$ ). Im Vergleich dazu war die Verteilung der Fasertypen bei AA-behandelten SMA-Mäusen ähnlich wie bei Mäusen ohne Körpergewicht ( $p = 0,968$ ) (Abb. 8c).

Die potenzielle schützende Wirkung von AA auf die NMJ wurde durch Immunfärbung von Synaptophysin als

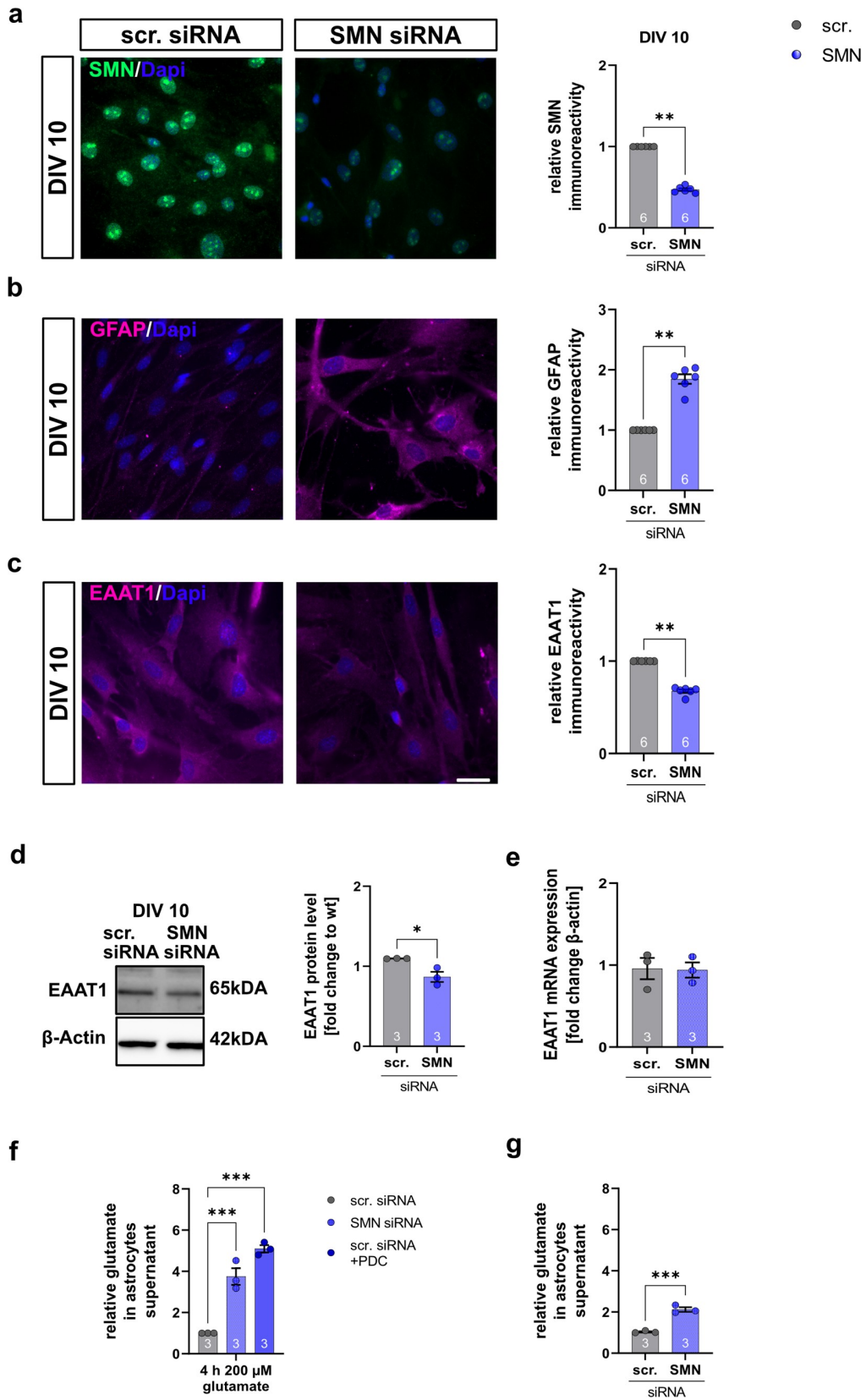


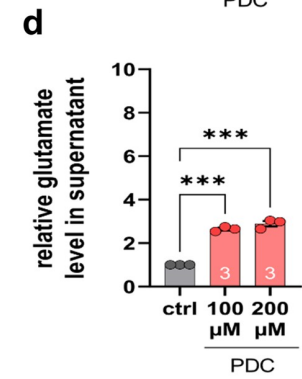
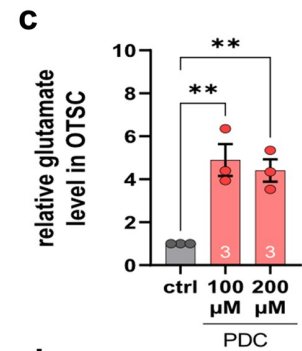
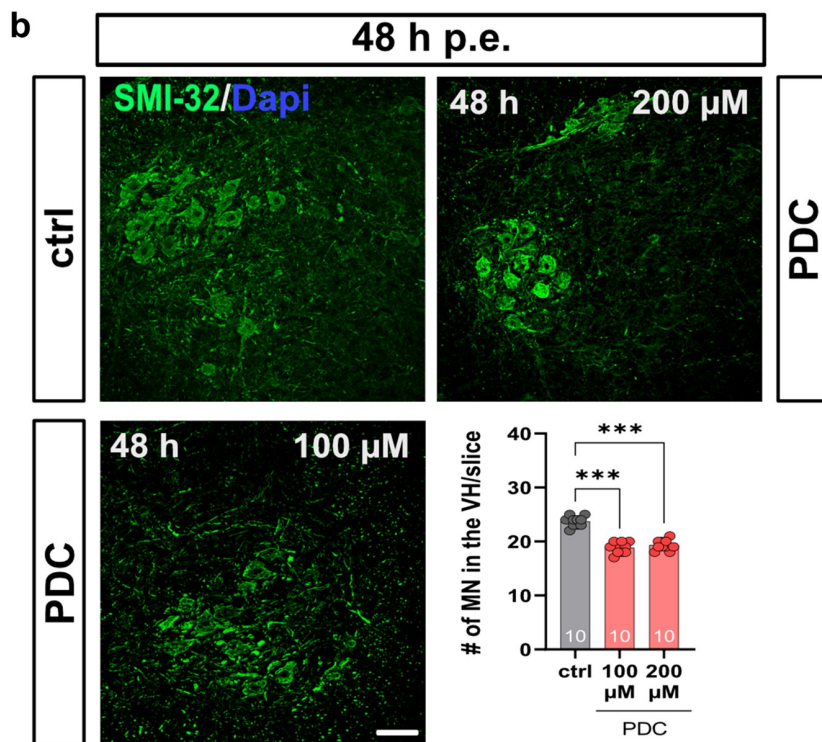
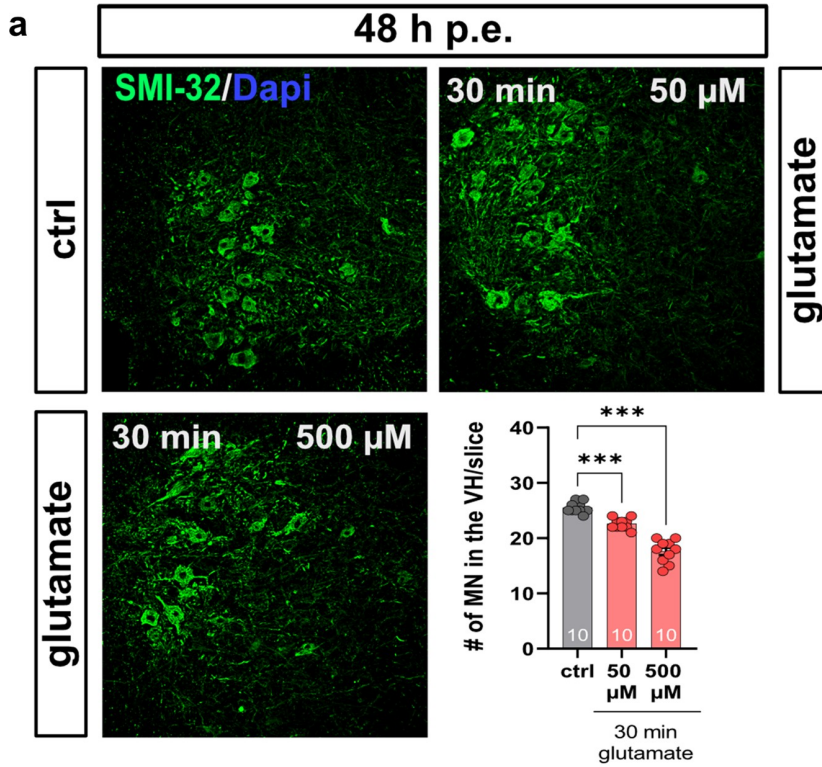
Abb. 4 SMA-ähnliche Astrozyten, die mit siRNA erzeugt wurden, zeigen ähnliche Proteinveränderungen und Störungen bei der Glutamataufnahme wie das SMA-Mausmodell im Spätstadium. **a** Immunfärbung von SMN (grün) in kultivierten wt-Astrozyten der Wirbelsäule, die mit scrambled oder *SMN1* siRNA bei DIV 10 transfiziert wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Astrozyten, die mit SMN siRNA transfiziert wurden, wiesen reduzierte SMN-Proteinspiegel auf ( $p < 0,01$ ). **b** Immunfärbung von GFAP (magenta) in kultivierten wt-Astrozyten der Wirbelsäule, die mit scrambled oder SMN siRNA transfiziert wurden, bei DIV

10. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Astrozyten, die mit SMN siRNA transfiziert wurden, zeigten erhöhte GFAP-Proteinspiegel im Vergleich zu Astrozyten, die mit scrambled siRNA transfiziert wurden ( $p < 0,01$ ). **c** Immunfärbung von EAAT1 (magenta) in kultivierten wt-Rückenmarksastrozyten, die mit scrambled oder SMN siRNA bei DIV 10 transfiziert wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Astrozyten, die mit SMN siRNA transfiziert wurden, zeigten reduzierte EAAT1-Proteinspiegel im Vergleich zu scrambled siRNA-transfizierten Zellen ( $p < 0,01$ ). **d** In der Western-Blot-Analyse war der EAAT1-Proteinspiegel in SMA-ähnlichen Astrozyten reduziert ( $p < 0,05$ ). **e** In der qPCR-Analyse wurde keine Veränderung der EAAT mRNA-Expression festgestellt ( $p > 0,05$ ). **f** Wenn mit Scrambled oder SMN siRNA transfizierte Astrozyten 4 Stunden lang  $200 \mu\text{M}$  Glutamat ausgesetzt wurden, zeigten SMN-defiziente Astrozyten eine reduzierte Glutamataufnahme ( $p < 0,001$ ). Ein ähnlicher Effekt wurde beobachtet, wenn mit scrambled siRNA transfizierte Astrozyten dem EAAT1-Inhibitor PDC ausgesetzt wurden. Die Glutamataufnahme war im Vergleich zu Zellen, die nicht mit PDC exponiert wurden, reduziert ( $p < 0,001$ ). **g** Astrozyten, die mit SMN siRNA transfiziert, aber nicht mit Glutamat exponiert wurden, zeigten eine erhöhte Freisetzung von Glutamat im Vergleich zu Astrozyten, die mit scrambled siRNA transfiziert wurden ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$  unabhängige Experimente für die Immunfärbung. Für jedes Experiment wurden  $> 50$  Zellen pro Bedingung analysiert.  $N = 3$  unabhängige Experimente für funktionelle Assays, qPCR und Western-Blot-Analyse. Maßstabsleiste:  $50 \mu\text{m}$ . Abkürzungen: DIV, Tage in vitro; EAAT1, exzitatorischer Aminosäuretransporter 1; GFAP, gliales fibrilläres Säureprotein; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure; PDC, *L-trans-Pyrrolidin-2,4-Dicarbonsäure*; qPCR, Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; siRNA, kleine Interferen-Ribonukleinsäure; SMN, Überleben des Motoneurons; wt, Wildtyp. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

präsynaptisch und  $\alpha$ -BTX als postsynaptischer Marker bei P44 (Abb. 8d). Bei AA-behandelten SMA-Mäusen war die Kolo-kalisierung von prä- und postsynaptischen Markern im Vergleich zu Vehikel-behandelten SMA-Mäusen erhöht ( $p = 0,005$ ), aber im Vergleich zu wt-Mäusen leicht reduziert ( $p = 0,032$ ) (Abb. 8e). Die Synaptophysin-Immunreaktivität und die postsynaptische Fläche waren bei mit Vehikel behandelten SMA-Mäusen reduziert ( $p < 0,0001$ , Abb. 8f;  $p < 0,0001$ , Abb. 8e). Wurden SMA-Mäuse mit AA behandelt, waren Synaptophysin und die postsynaptische Fläche immer noch leicht reduziert ( $p = 0,006$ , Abb. 8f;  $p = 0,032$ , Abb. 8e), aber im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten SMA-Mäusen erhöht ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 8f, g).

### Beeinträchtigte Glutamat-Homöostase bei Patienten mit spät einsetzender SMA

Um translationale Beweise für die Rolle der EAAT1-gesteuerten Glutamat-Toxizität bei SMA zu erbringen, untersuchten wir induzierte menschliche Astrozyten von gesunden Personen, Liquor und Serumproben von SMA-Patienten im Spätstadium. In Astrozyten, die aus menschlichen Fibroblasten, die mit *SMN1* siRNA transfiziert wurden, umgewandelt wurden, waren die SMN- und EAAT1-Spiegel reduziert ( $p = 0,0001$ ) (Abb. 9a, b). Darüber hinaus war die Glutamat-Messung im Überstand von SMN-defizienten induzierten humanen Astrozyten erhöht ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 9c). Nach 4-stündiger Exposition mit  $200 \mu\text{M}$  Glutamat zeigten SMA-ähnliche induzierte menschliche Astrozyten eine verringerte Aufnahme von Glutamat ( $p = 0,0056$ ) (Abb. 9d).





• Abb. 5 Ex-vivo-Modell des Glutamat-vermittelten MN-Todes. **a** Immunfärbung von spinalen MNs (SMI-32, grün) in OTSCs von wt-Mäusen 48 h nach Exposition (p.e.) mit einem 30-minütigen Puls von 50 oder 500  $\mu$ M Glutamat. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Achtundvierzig Stunden nach dem Glutamat-Puls war die Anzahl der spinalen MNs reduziert ( $p < 0,001$ ). **b** Immunfärbung spinaler MNs (SMI-32, grün) in OTSC von wt-Mäusen nach 48-stündiger Exposition mit dem EAAT1-Inhibitor PDC. Die Hemmung von EAAT1 reduzierte die spinalen MNs nach 48 Stunden ( $p < 0,001$ ). **c** Die PDC-Behandlung erhöhte den Glutamat Spiegel in OTSC ( $p > 0,01$ ). **d** Die PDC-Behandlung erhöhte den Glutamat Spiegel im Überstand von OTSCs ( $p > 0,001$ ).  $n = 10$  Scheiben pro Bedingung. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. Abkürzungen: EAAT1, exzitatorischer Aminosäuretransporter 1; MN, Motoneuron; OTSC, organotypische Rückenmarksschnittkulturen; PDC, *L-trans-Pyrrolidin-2,4-dicarbonsäure*; SMI-23, schweres Neurofilamentpolypeptid; wt, Wildtyp; #, Anzahl pro Schnitt. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

Die Glutamatkonzentrationen in menschlichen Liquor- und Serumproben von Patienten mit SMA Typ 2 und 3 im Spätstadium waren im Vergleich zu gesunden Personen erhöht ( $p = 0,01$ , Abb. 9e;  $p = 0,001$ , Abb. 9f). Außerdem waren die EAAT1-Spiegel in Liquorproben von SMA-Typ-2- und -3-Patienten reduziert ( $p < 0,0001$ ). Bei den mit Nusinersen behandelten Patienten war keine Veränderung der EAAT1-Konzentration im Liquor im Vergleich zu den SMA-Basisbedingungen feststellbar ( $p = 0,996$ ), was darauf hindeutet, dass EAAT1 ein SMN-unabhängiges Ziel ist (Abb. 9g). EAAT1-Protein war in Serumproben von SMA-Patienten oder gesunden Personen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

## Diskussion

Unsere Studie konzentrierte sich auf die Rolle der Astrozyten des Rückenmarks in der Pathogenese der spät einsetzenden SMA. Wir haben Beweise für die entscheidende Beteiligung des Glutamat-Aufnahmeproteins EAAT1 erbracht, indem wir die Glutamat Spiegel im Rückenmark mit einem translationalen Ansatz erhöht haben. Darüber hinaus bieten wir eine neuroprotektive Strategie an, die die Expression von EAAT1 erhöht.

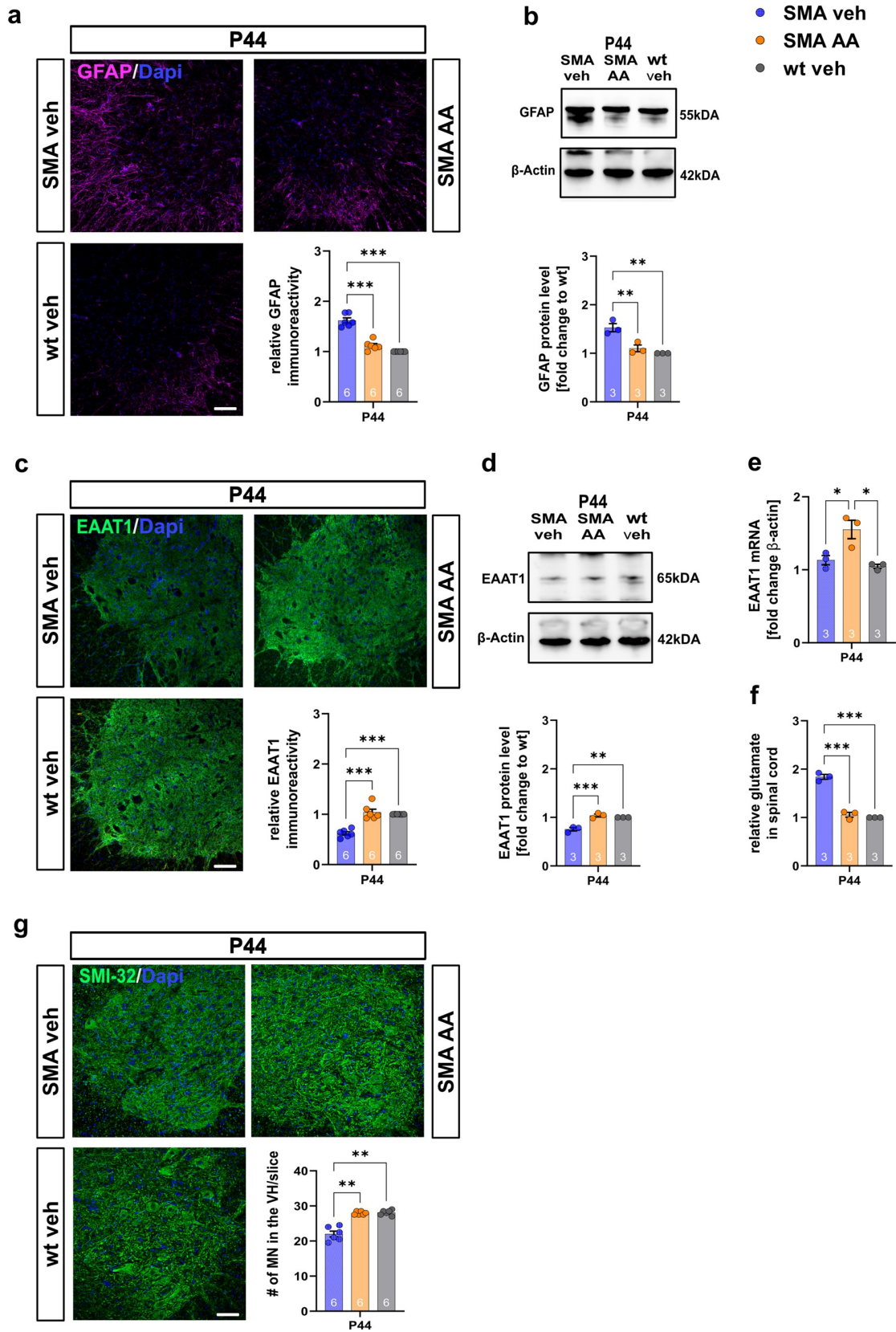
durch die Verabreichung des Astrozyten-modulierenden Lipids AA in vivo, was EAAT1 als potenzielles therapeutisches Ziel für die SMN-unabhängige Behandlung von SMA qualifiziert.

Das SMA-Mausmodell spiegelt einen weniger schweren Krankheitsverlauf der SMA wider [41]. Diese Mäuse zeigen eine reduzierte Expression des SMN-Proteins im Rückenmarksgewebe, eine normale Lebenserwartung und Anzeichen einer leichten Parese der Hintergliedmaßen aufgrund von MN-Verlust, Verlust von Typ-2-Muskelfasern und denervierter NMJ sowie ein reduziertes Körpergewicht, wie in anderen SMA-Modellen [30, 57]. In schweren SMA-Mausmodellen können Stoffwechselprobleme und Veränderungen des Körpergewichts durch verschiedene Diäten rückgängig gemacht werden; entweder eine fettarme oder fettreiche Diät kann zu einer Erhöhung des Körpergewichts und der Überlebensdauer führen [10, 15] und ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Im Gegensatz zu den schweren SMA-Modellen kommt es im Spätmodell im Krankheitsverlauf zu nekrotischem Ohr- und Schwanzgewebe, verursacht durch Gewebeischämie oder Skelettmuskeldenergieverlust, verbunden mit einer verlängerten Lebensspanne dieses Modells [32, 54, 58, 67]. Diese nekrotischen Prozesse gehören nicht zum üblichen Phänotyp der menschlichen SMA.

Jüngste Studien haben gezeigt, dass SMA aufgrund der weiten Verbreitung des SMN-Proteins im ZNS nicht mehr ausschließlich eine Erkrankung der Motoneuronen ist, was darauf hindeutet, dass es sich bei SMA um eine Multisystemerkrankung handelt [71]. Der entscheidende Beitrag von Astrozyten zu Erkrankungen des ZNS wurde für Krankheiten wie die Alzheimer-Krankheit oder Epilepsie nachgewiesen [6, 31, 53, 56]. Es wird angenommen, dass Astrozyten auch bei der Pathogenese der SMA eine entscheidende Rolle spielen. Die meisten dieser Studien zeigten eine frühe verstärkte Expression von GFAP als Zeichen einer erhöhten Reaktivität der spinalen Astrozyten, bevor der Verlust der spinalen MN in schweren Mausmodellen auftrat, oder haben kürzlich höhere Werte im Liquor von SMA-Patienten nachgewiesen [22, 33, 45, 59].

Keine dieser Studien hat jedoch den Beitrag der Astrozyten zum MN-Verlust in einem funktionell-mechanistischen und translationalen Ansatz bestätigt, der zur Identifizierung astrozytärer Proteine als potenzielle neue therapeutische Ziele führt.

Eine wichtige Funktion der Astrozyten ist die Regulierung des extrazellulären Glutamat Spiegels, indem sie über EAAT-Proteine erregende Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt aufnehmen und so





**Abb. 6** Die In-vivo-Verabreichung von AA hemmt die Astrozytenaktivierung, erhöht die EAAT1-Expression und verhindert den Verlust von MN. **a** Immunfärbung von GFAP (magenta) in den ventralen Hörnern des Rückenmarks von wt oder SMA Mäuse, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. SMA-Mäuse, die mit Vehikel behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße erhöhte GFAP-Proteinspiegel auf ( $p < 0,001$ ). Bei SMA-Mäusen, die mit AA behandelt wurden, war der GFAP-Proteinspiegel im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten SMA-Tieren reduziert ( $p < 0,001$ ). **b** Western-Blot-Analyse des GFAP-Proteinspiegels in der Wirbelsäule von wt- oder SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden. Es wurden ähnliche Effekte wie bei der Immunfärbung beobachtet ( $p < 0,01$ ). **c** Immunfärbung von EAAT1 (grün) in den ventralen Hörnern des Rückenmarks von wt- oder SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. SMA-Mäuse, die mit Vehikel behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu wt-Mäusen reduzierte EAAT1-Proteinspiegel ( $p < 0,001$ ). Bei SMA-Mäusen, die mit AA behandelt wurden, war der EAAT1-Proteinspiegel im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten SMA-Tieren erhöht ( $p < 0,001$ ). **d** Western-Blot-Analyse des EAAT1-Proteinspiegels im Rückenmarksgewebe von wt- oder SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden. Es wurden ähnliche Effekte wie bei der Immunfärbung beobachtet ( $p < 0,01$  bis  $p < 0,001$ ). **e** Der EAAT1-mRNA-Spiegel war bei AA-behandelten SMA-Mäusen erhöht ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu war die mRNA-Konzentration bei SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel behandelt wurden, nicht beeinträchtigt ( $p > 0,05$ ). **f** Messung des Glutamatspiegels im Rückenmarksgewebe von wt- oder SMA-Mäusen, die mit dem Vehikel oder AA behandelt wurden, unter Verwendung eines Glutamat-Assay-Kits. Der Glutamatspiegel im Rückenmarksgewebe von mit Vehikel behandelten SMA-Mäusen war im Vergleich zu wt-Mäusen erhöht ( $p < 0,001$ ). Bei SMA-Mäusen, die mit AA behandelt wurden, war der Glutamatspiegel in ihrem Rückenmarksgewebe auf das Kontrollniveau reduziert ( $p < 0,001$ ). **g** Immunfärbung von spinalen MN (SMI-32, grün) in den ventralen Hörnern des Rückenmarks von wt- oder SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Mit Fahrzeug behandelte SMA-Mäuse wiesen im Vergleich zu wt-Mäusen bei P44 eine geringere Anzahl von MNs auf ( $p < 0,01$ ). Wenn SMA-Mäuse mit AA behandelt wurden, blieb die Anzahl der MNs auf dem Niveau von wt-Mäusen ( $p < 0,01$  zu Vehikel-SMA;  $p > 0,05$  zu wt).  $n = 6$  Tiere pro Bedingung für Immunfärbung. Es wurden drei Schnitte pro lumbales Rückenmark untersucht. Jeder Datenpunkt spiegelt den Mittelwert von drei Rückenmarksschnitten pro Tier wider.  $N = 3$  Tiere pro Bedingung für Western-Blot-Analyse, qPCR-Analyse und Glutamattmessungen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Abkürzungen: AA, Arundensäure; EAAT1, exzitatorischer Aminosäuretransporter 1; GFAP, gliales fibrilläres Säureprotein; MN, Motoneuron; mRNA, Boten-Ribonukleinsäure; P, postnataler Tag; qPCR, Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion; SMA, spinale Muskelatrophie; SMI-23, schweres Neurofilament-Polypeptid; wt, Wildtyp; #, Anzahl pro Scheibe. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

liefern wir Beweise für die EAAT1-vermittelte Glutamat-Toxizität als eine wichtige treibende Kraft für die MN-Degeneration bei spät einsetzender SMA.

Schutz der Neuronen vor Exzitotoxizität [29, 60, 61]. Funktionsstörungen des Astrozyten-vermittelten Glutamatttransports wurden bei ZNS-Erkrankungen wie Epilepsie, Morbus Alzheimer und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) festgestellt [21, 29, 64, 65]. Hier

Die früh beobachtete EAAT1-Reduktion deutete auf einen Glutamat-vermittelten MN-Verlust hin, was wir durch erhöhte Glutamatspiegel im Rückenmark und ein ähnliches Muster in SMA-ähnlichen Astrozyten bestätigten. Dieser Effekt trat jedoch nur auf der Proteinebene, nicht aber auf der mRNA-Ebene auf, was auf eine posttranskriptionelle Modulation der EAAT1-mRNA durch Prozesse wie Methylierung oder Beteiligung von Mikro-(mi)-RNA schließen lässt [5, 37]. Aufgrund unserer Zellkulturexperimente an Maus- und menschlichen Astrozyten können wir von einer autonomen Reduktion von EAAT1 in spinalen Astrozyten als Folge des SMN-Proteinmangels ausgehen und nicht von einer Reaktion auf den exogenen Einfluss anderer Zelltypen, wie Mikroglia oder verschiedener Immunzellen. Darüber hinaus wurde der direkte Zusammenhang zwischen der EAAT1-Dysfunktion und der gestörten Glutamataufnahme mit Hilfe von PDC in unserem Ex-vivo-Modell bestätigt.

Die erhöhten Glutamatwerte in Überständen von SMN-defizienten Mäusen oder induzierten menschlichen Astrozyten in vitro-Modellen deuten darauf hin, dass die veränderte astrozytäre Glutamatfreisetzung neben der neuronalen Freisetzung eine zusätzliche Quelle für die Glutamaterhöhung im Rückenmarksgewebe sein könnte. Diese Ergebnisse werden durch erhöhte Glutamatspiegel in Liquor- und Serumproben von SMA-Typ-2- und -3-Patienten ergänzt. Darüber hinaus war der EAAT1-Spiegel in Liquorproben von SMN-Patienten zu Beginn der Studie reduziert, was seine klinische Relevanz beweist. Als SMA-Patienten mit Nusinersen behandelt wurden, veränderte sich der EAAT1-Spiegel im Liquor im Vergleich zum Ausgangszustand nicht, was darauf hindeutet, dass EAAT1 ein SMN-unabhängiges potenzielles therapeutisches Ziel ist.

Exzitotoxizität durch Glutamat als Ursache der neuronalen Degeneration ist bei anderen Erkrankungen wie ALS weithin anerkannt [17, 34]. Glutamat ist ein entscheidender Botenstoff für die korrekte physiologische Funktion von Nervenzellen und Astrozyten und deren Interaktionen [20, 44, 63]. Erhöhte Glutamatspiegel sind für MNs und die sie umgebenden Zellen toxisch [17, 48]. Eine unzureichende oder gestörte Glutamataufnahme aus Astrozyten kann die Übererregung von N-Methyl-D-Aspartat- und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren erhöhen. Motoneuronen scheinen besonders empfindlich auf AMPA-vermittelte Glutamat-Toxizität zu reagieren, die aufgrund von kalziumpermeablen AMPA-Rezeptor-Untereinheiten den intrazellulären Kalziumspiegel erhöht und den Tod von MN fördert [11, 38, 68]. Hier zeigen wir anhand von in vitro- und in vivo-Experimenten, dass eine EAAT1-Dysfunktion an diesem Prozess beteiligt ist. Der Beitrag von AMPA- oder anderen Glutamatrezeptoren zur Pathogenese der SMA muss in weiteren Studien

untersucht werden.

Arundsäure ist ein Lipid, das nachweislich die astrozytäre Aktivität hemmt, die Expression von EAAT1 im Gehirn verstärkt und

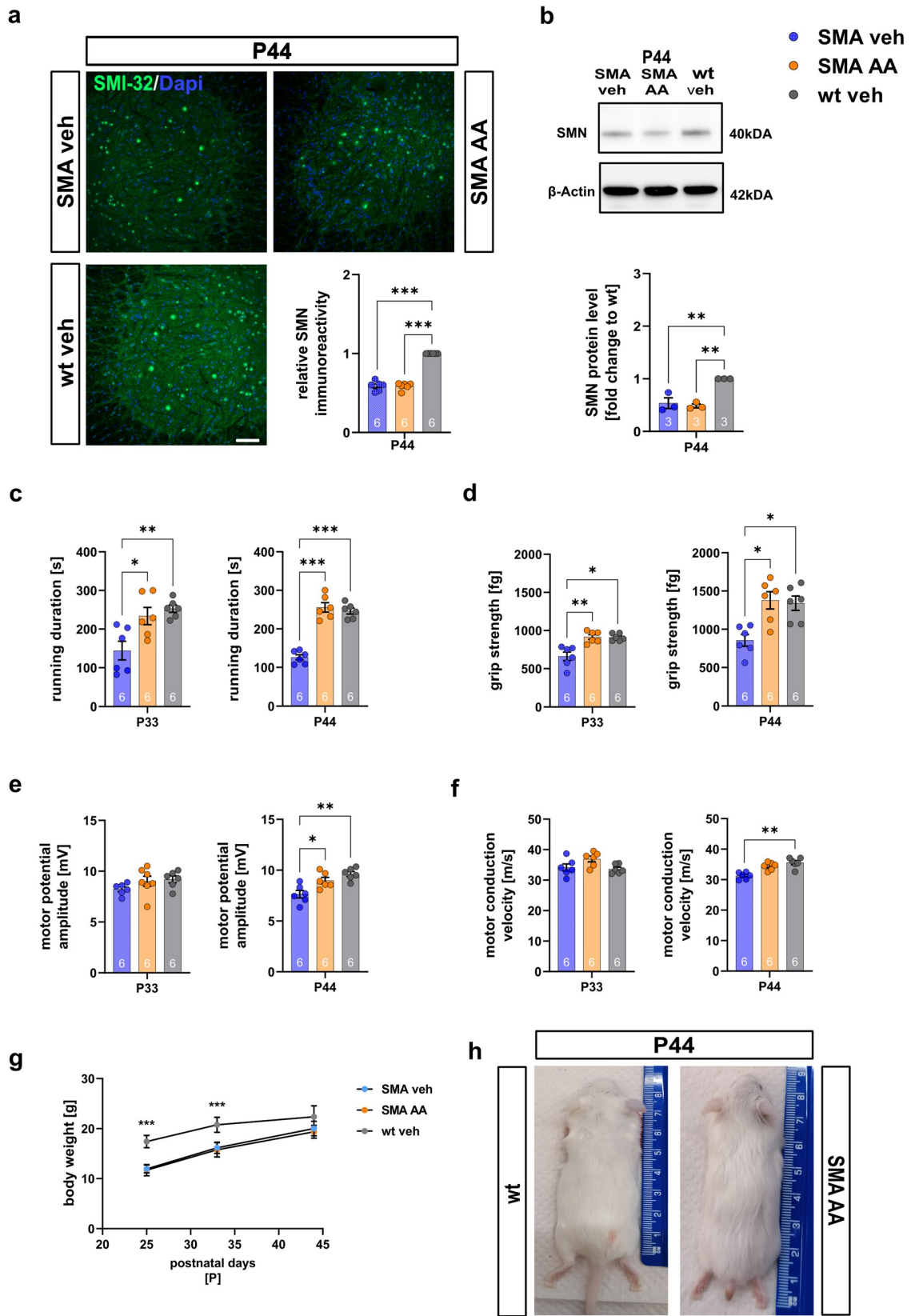


Abb. 7 Arundsäure erhält die motorischen Funktionen und elektrophysiologischen Eigenschaften von Mäusen mit spät einsetzender SMA auf eine SMN-unabhängige Weise. **a** Immunfärbung von SMN (grün) in den Venenhörnern des Rückenmarks von Mäusen mit wt oder SMA, die mit Vehikel oder AA bei P44 behandelt wurden.

Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Die relative SMN-Protein-Konzentration in den ventralen Hörnern von SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA behandelt wurden, war im Vergleich zu wt-Vehikel-Mäusen reduziert ( $p < 0,001$ ), was bestätigt, dass die Auswirkungen von AA SMN-unabhängig waren. **b** Western-Blot-Analyse der SMN-Protein-Konzentration im Rückenmarksgewebe von wt-Vehikel-behandelten oder Vehikel- oder AA-behandelten SMA-Mäusen bei P44. Beta-Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. SMA-Mäuse zeigten reduzierte SMN-Proteinspiegel ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu wt-Mäusen. **c** Rotarod-Bewertung von wt- oder SMA-Mäusen, die mit Vehikel oder AA bei P33 und P44 behandelt wurden. Mit Vehikel behandelte SMA-Mäuse zeigten im Vergleich zu wt-Mäusen bei P33 ( $p < 0,01$ ) und P44 ( $p < 0,001$ ) eine reduzierte Laufdauer auf dem Rotarod. Wenn SMA-Mäuse mit AA behandelt wurden, war die Laufdauer im Vergleich zu den mit dem Vehikel behandelten SMA-Mäusen bei P33 ( $p < 0,05$ ) und P44 ( $p < 0,001$ ) verlängert. **d** Messungen der Griffkraft von Mäusen mit wt oder SMA, die mit dem Vehikel oder AA bei P33 und P44 behandelt wurden. Mit dem Vehikel behandelte SMA-Mäuse zeigten bei P33 ( $p < 0,05$ ) und P44 ( $p < 0,05$ ) eine verringerte Griffkraft im Vergleich zu Mäusen ohne Körpergewicht. Die Greifkraft der mit AA behandelten SMA-Mäuse war bei P33 ( $p < 0,01$ ) und P44 ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den mit dem Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen verbessert. **e** MPA-Messungen von Mäusen ohne Körpergewicht und SMA-Mäusen, die mit Fahrzeug oder AA bei P33 und P44 behandelt wurden. Bei P44 war die MPA bei mit Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen im Vergleich zu mit AA behandelten SMA-Mäusen ( $p < 0,05$ ) und mit Fahrzeug behandelten Mäusen ohne Körpergewicht ( $p < 0,01$ ) reduziert. **f** Bei P44 war die motorische Leitungsgeschwindigkeit bei mit Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen im Vergleich zu Mäusen ohne Körpergewicht leicht reduziert ( $p < 0,01$ ). **g** Das Körpergewicht von SMA-Mäusen wurde durch AA nicht verändert. **h** Der Phänotyp von SMA-Mäusen wurde durch die Behandlung mit AA nicht beeinflusst.  $N = 6$  Tiere pro Bedingung für die Immunfärbung. Drei Schnitte pro lumbales Rückenmark wurden untersucht. Jeder Datenpunkt spiegelt den Mittelwert von drei Rückenmarksschnitten pro Tier wider.  $N = 3$  Tiere pro Bedingung für die Western-Blot-Analyse und Glutamat-Messungen.  $N = 6$  Tiere pro Bedingung für motorisches Verhalten und elektrophysiologische Experimente. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . AA Arundsäure, MPA Motorische Potentialamplitude, P Postnataler Tag, SMA Spinale Muskelatrophie, SMN, Überleben von Motoneuronen, wt, Wildtyp. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

die Aufnahme von Glutamat in den Astrozyten zu erhöhen [36, 70]. In einer Studie über intrazerebrale Blutungen, einem schweren Schlaganfall-Subtyp, verbesserte die direkte Verabreichung von AA in das linke Striatum von Mäusen die Griffkraft und das Ergebnis des Gehversuchs [13]. In unserer Studie verhinderte die Verabreichung von AA an SMA-Mäuse, wenn die EAAT1-Expression reduziert war, aber vor dem Beginn des MN-Verlustes, diesen Verlust, indem sie die EAAT1-Expression steigerte und den Glutamat Spiegel in SMA-Mäusen reduzierte. Die verstärkte Expression von EAAT1 mRNA deutet auf einen direkten Transkriptionseffekt von AA auf EAAT1 hin. AA induziert die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B und dessen Bindung an den EAAT1-Promotor. Darüber hinaus wird die Aktivierung der AKT- und ERK-Signalwege durch AA als ein EAAT1-verstärkender Mechanismus diskutiert [36]. Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese der EAAT1-vermittelten Glutamat-Toxizität als entscheidenden Mechanismus in der frühen Pathogenese der spät einsetzenden SMA. Neben den zellulären Veränderungen führte die Verabreichung von AA auch zu einer Verbesserung der phänotypischen Krankheitsmanifestationen in unserem SMA-Mausmodell. AA verhinderte den Verlust von Typ-2-Muskelfasern bei SMA-Mäusen im Spätstadium, was auf eine direkte Wirkung von AA auf das Muskelgewebe schließen lässt.

Interessanterweise verlangsamte AA den Denervierungsprozess der neuromuskulären Verbindungen erheblich, schützte sie aber nicht vollständig. Ein solcher Schutzeffekt könnte durch den verhinderten Verlust von spinalen MN nach der Steigerung der EAAT 1-Proteinexpression oder durch eine zusätzliche positive Wirkung von AA auf Schwann-Zellen erklärt werden. Diese Zellen sind entscheidend für die Strukturierung der NMJ während ihrer Entwicklung oder Regeneration, indem sie motorische Axone leiten [3]. Daher sollte ein früherer Verabreichungszeitpunkt vorgeschlagen werden, um die neuromuskulären Verbindungsstellen durch AA vollständig zu schützen. Die direkte Wirkung von AA auf Schwann-Zellen muss jedoch in zukünftigen Studien untersucht werden.

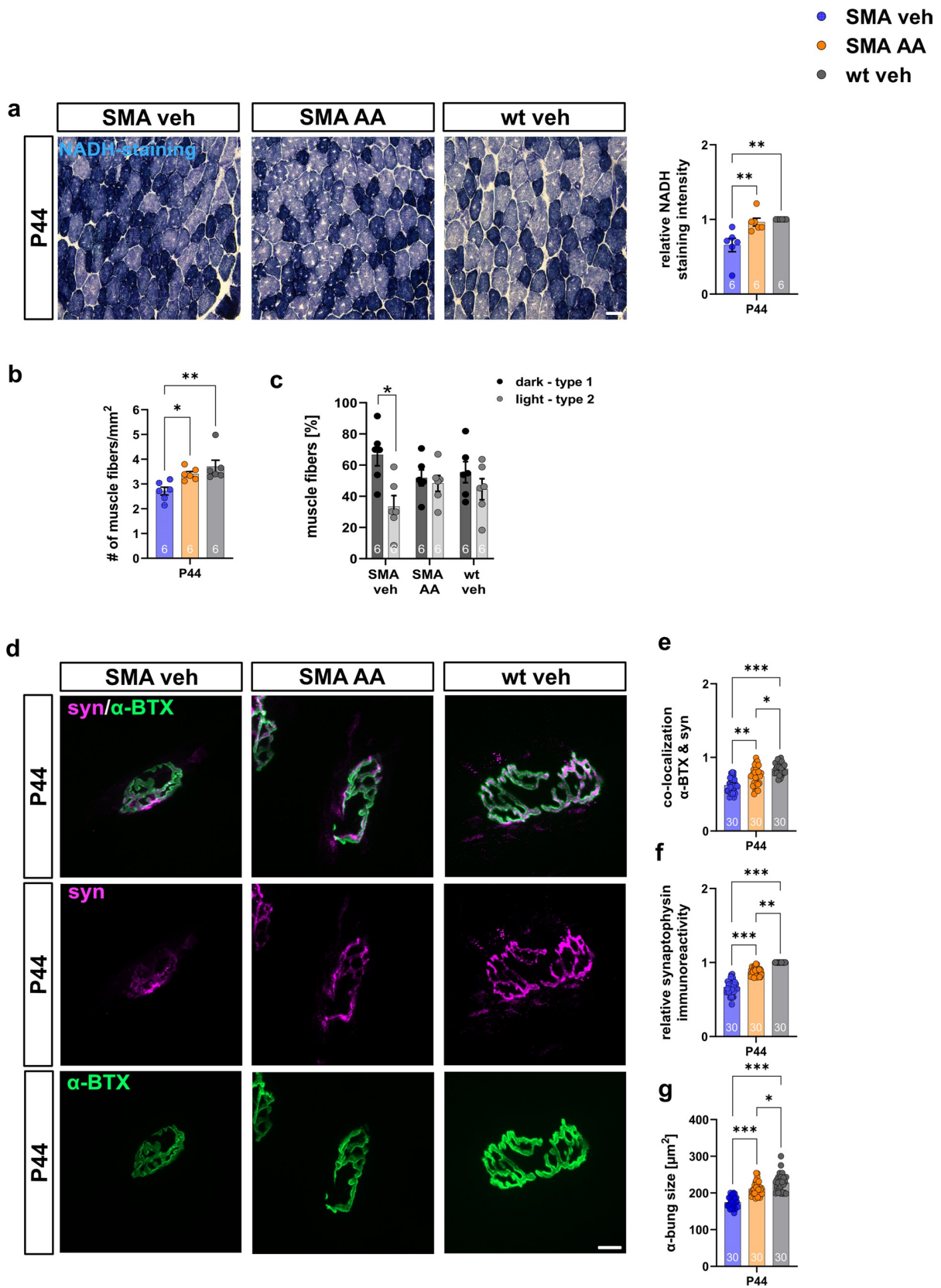


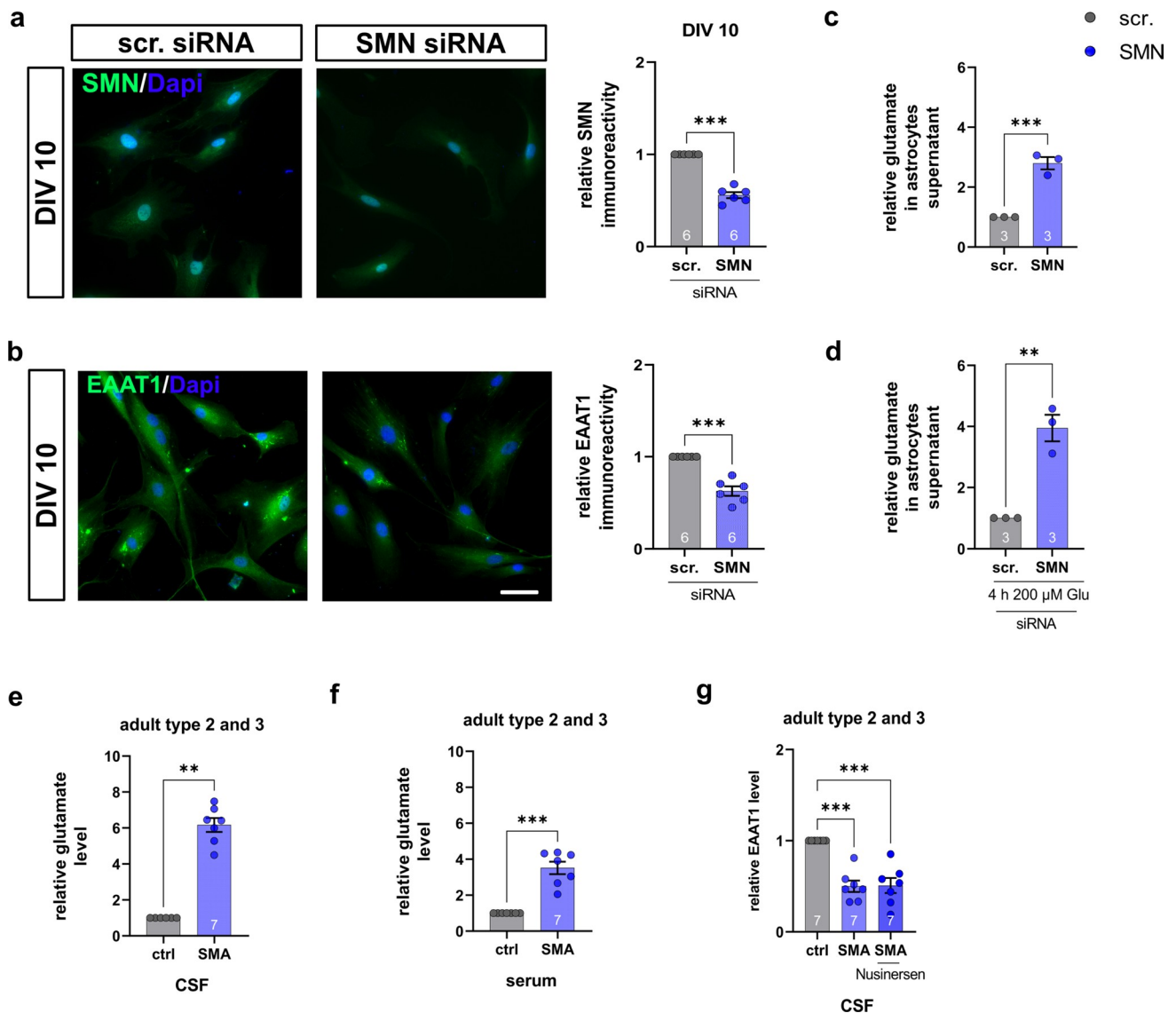


Abb. 8 Arundinsäure erhält die NMJ und den Verlust von Typ-2-Muskelfasern im *M. tibialis anterior*. **a** NADH-Färbung des *M. tibialis anterior* von Mäusen mit spät einsetzender SMA, die mit AA oder Vehikel behandelt wurden, im Vergleich zu wt-Mäusen bei P44. Typ-1-Muskelfasern sind dunkel gefärbt, während Typ-2-Fasern hell gefärbt sind. Die Intensität der NADH-Färbung war bei mit Vehikel behandelten SMA-Mäusen reduziert (dunkler werdend) im Vergleich zu wt ( $p < 0,01$ ) und AA-behandelten SMA-Mäusen ( $p < 0,01$ ). **b** Die Gesamtzahl der Muskelfasern war bei mit Vehikel behandelten SMA-Mäusen reduziert ( $p < 0,01$ ), aber nicht bei AA-behandelten SMA-Mäusen ( $p > 0,05$  oder  $p < 0,05$ ). **c** Die Anzahl der lichtgefärbten Typ-2-Fasern war bei mit Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen reduziert ( $p < 0,05$ ), während SMA-Mäuse, die mit AA behandelt wurden, nicht betroffen waren ( $p > 0,05$ ). **d** Immunfärbung von präsynaptischem Synaptophysin (magenta) und postsynaptischem  $\alpha$ -BTX (grün) an der NMJ von SMA-Mäusen mit spätem Auftreten, die mit AA oder Vehikel behandelt wurden, im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße bei P44. **e** Bei SMA-Mäusen, die mit Vehikel behandelt wurden, war die Ko-Lokalisation von synaptischen Proteinen reduziert ( $p < 0,001$ ). Bei AA-behandelten SMA-Mäusen war die Ko-Lokalisation im Vergleich zu Vehikel-behandelten SMA-Mäusen verstärkt ( $p < 0,01$ ), aber im Vergleich zu wt-Mäusen reduziert ( $p < 0,05$ ). **f** Die Synaptophysin-Immunreaktivität war bei Vehikel-behandelten SMA-Mäusen reduziert ( $p < 0,001$ ), aber bei mit AA behandelten SMA-Mäusen im Vergleich zu Vehikel-behandelten SMA-Mäusen verstärkt ( $p < 0,001$ ). Die Synaptophysin-Immunreaktivität war im Vergleich zu wt-Mäusen immer noch reduziert ( $p < 0,01$ ). **g** Die präsynaptische Größe der NMJ war bei mit Fahrzeug behandelten SMA-Mäusen reduziert ( $p < 0,001$ ), aber bei mit AA behandelten SMA-Mäusen erhöht ( $p < 0,001$ ). Die präsynaptische Größe in AA-behandelten SMA-Mäusen war leicht reduziert im Vergleich zu Mäusen mit normaler Körpergröße ( $p < 0,05$ ).  $n = 6$  Tiere pro Bedingung für die NADH-Färbung. Es wurden drei Schnitte pro Tier untersucht.  $N = 30$  neuromuskuläre Endplatten wurden insgesamt pro Bedingung analysiert. Fünf Endplatten pro Tier, 6 Tiere pro Bedingung. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. AA Arundinsäure,  $\alpha$ -BTX  $\alpha$ -Bungarotoxin, NADH Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Wasserstoff, NMJ neuromuskuläre Verbindung, SMA spinale Muskelatrophie, wt, Wildtyp. P-Werte: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

Die wiederholte in vivo-Verabreichung von AA an SMA-Mäuse hatte keinen Einfluss auf den SMN-Proteinspiegel, was darauf hindeutet, dass seine therapeutischen Wirkungen SMN-unabhängig sind. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Studien weitere SMN-unabhängige Zielmoleküle, wie die Rho-Kinase (ROCK), die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) und die c-Jun N-terminal Kinase (JNK) identifiziert [7-9, 23, 25-28, 55, 62].

Die derzeitigen SMN-verstärkenden Medikamente haben einen beeindruckenden Nutzen bei SMA-Patienten. Dennoch können nicht alle motorischen Funktionen bei Patienten mit diesen Medikamenten gesteigert werden [24, 52]. Darüber hinaus wirkt sich eine verzögerte Verabreichung, insbesondere bei SMA-Patienten im Spätstadium, negativ auf die Wirksamkeit des Medikaments aus, da es zu einem irreversiblen Verlust der spinalen MN kommt. Daher könnten ergänzende Strategien, wie die Steigerung der EAAT1-Expression in spinalen Astrozyten, ein synergistisches therapeutisches Potenzial haben.

Unsere Studie zeigt die kritische Beteiligung der spinalen Astrozyten an der Pathogenese der spät einsetzenden SMA in einem funktionellen und translationalen Ansatz. Zum ersten Mal wurde die durch die Herunterregulierung von EAAT1 vermittelte Glutamat-Toxizität als eine bedeutende treibende Kraft für den frühen MN-Verlust bei spät einsetzender SMA identifiziert und qualifiziert EAAT1 als potenzielles therapeutisches Ziel für SMN-unabhängige Behandlungsstrategien zur Ergänzung von SMN-verstärkenden Medikamenten in der Therapie der spät einsetzenden SMA.



**Abb. 9** Beeinträchtigte Glutathomöostase in induzierten menschlichen Astrozyten und menschlichen Liquor- und Serumproben. **a** Immunfärbung von SMN (grün) in induzierten menschlichen Astrozyten, die mit scrambled oder *SMN* siRNA bei DIV 10 transfiziert wurden. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Astrozyten, die mit *SMN* siRNA transfiziert wurden, wiesen reduzierte SMN-Proteinspiegel auf ( $p < 0,001$ ). **b** Immunfärbung von EAAT1 (grün) in induzierten menschlichen Astrozyten, die mit scrambled oder *SMN* siRNA transfiziert wurden, bei DIV 10. Nukleäre DNA wurde mit Dapi (blau) gefärbt. Astrozyten, die mit *SMN* siRNA transfiziert wurden, zeigten reduzierte EAAT1-Proteinspiegel im Vergleich zu mit Scrambled siRNA transfizierten Zellen ( $p < 0,001$ ). **c** Induzierte humane Astrozyten, die mit *SMN* siRNA transfiziert, aber nicht mit Glutamat exponiert wurden, zeigten eine erhöhte Freisetzung von Glutamat im Vergleich zu Astrozyten, die mit verschlüsselter siRNA transfiziert wurden ( $p < 0,001$ ). **d** Wenn verschlüsselte oder mit *SMN* siRNA transfizierte induzierte humane Astrozyten 4 Stunden lang mit 200  $\mu$ M Glutamat exponiert wurden, zeigten *SMN*-defiziente

induzierte menschliche Astrozyten zeigten eine verringerte Aufnahme von Glutamat ( $p < 0,01$ ). **e** Liquorproben von SMA-Typ 2- und 3-Patienten zeigten erhöhte Glutamatspiegel im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0,01$ ). **f** Serumproben von SMA-Typ 2- und 3-Patienten zeigten erhöhte Glutamatspiegel im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0,001$ ). **g** In Liquorproben von SMA-Typ 2- und Typ 3-Patienten war der EAAT1-Spiegel vor der Behandlung reduziert. Die Behandlung mit Nusinersen hatte keinen Einfluss auf den EAAT1-Spiegel.  $n = 6$  unabhängige Experimente zur Immunfärbung. Für jedes Experiment wurden  $> 50$  Zellen pro Bedingung analysiert.  $n = 3$  unabhängige Experimente für funktionelle Assays.  $n = 7$  Patienten für Glutamat-Assay von Liquor- oder Serumproben. Maßstabsleiste: 50  $\mu$ m. *DIV* Tage in vitro; EAAT1, exzitatorischer Aminosäuretransporter 1, *siRNA* small interfering ribonucleic acid, *SMA* spinale Muskelatrophie, *SMN* Überleben von Motoneuronen. P - W e r t e : \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , oder \*\*\* $p < 0,001$

**Ergänzende Informationen** Die Online-Version enthält zusätzliches Material, das unter <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02554-4> verfügbar ist.

**Danksagung** Wir danken Anna Hamker (Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Essen) für ihre Unterstützung bei den qPCR-Experimenten. Menschliche biologische Proben wurden von der Westdeutschen Biobank Essen (WBE, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland, 16-7290-BO) zur Verfügung gestellt.

**Beiträge der Autoren** Konzeptualisierung: ML; Methodik: L-IS, ML, SH, CD, RS, AR; formale Analyse und Untersuchung: L-IS, SH; Schreiben - Erstellung des ursprünglichen Entwurfs: L-IS; schriftliche Überprüfung und Bearbeitung: CK, US-S, AR, ML, TH; Beschaffung von Finanzmitteln: TH, ML, L-IS; Ressourcen: CK, TH; Aufsicht: ML, TH. Alle Autoren haben das endgültige Manuskript gelesen und genehmigt.

**Finanzierung** Open-Access-Finanzierung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL. Die Autoren (L-IS, ML, TH) wurden vom "Förderverein Universitätsneurologie e.V." gefördert.

**Datenverfügbarkeit** Die Daten, die die Ergebnisse der Studie untermauern, sind auf Anfrage bei der entsprechenden Autorin (L-IS) erhältlich.

## Erklärungen

**Interessenkonflikte** Die Autoren haben keine konkurrierenden Interessen zu erklären, die für den Inhalt dieses Artikels relevant sind.

**Ethikgenehmigung** Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Studie wurde von der Bioethikkommission der Universität Duisburg-Essen genehmigt (Genehmigungsnummer 18-8285-BO; 19-9011-BO).

**Forschung mit menschlichen und/oder tierischen Teilnehmern** Alle Experimente wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Darüber hinaus wurden das verwendete SMA-Mausmodell und die In-vivo-Versuche vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) in Nordrhein-Westfalen, Deutschland, genehmigt (AktENZEICHEN 81-02.04-2020.A335; 81-02.03.2021.A078).

**Open Access** Dieser Artikel steht unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International License, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium oder Format erlaubt, solange der/die ursprüngliche(n) Autor(en) und die Quelle in angemessener Weise genannt werden, ein Link zur Creative Commons-Lizenz angegeben wird und angegeben wird, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die Bilder oder anderes Material Dritter in diesem Artikel sind in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels enthalten, es sei denn, es wird in einer Kreditlinie zu dem Material anders angegeben. Wenn das Material nicht in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels enthalten ist und Ihre beabsichtigte Nutzung nicht durch gesetzliche Bestimmungen erlaubt ist oder über die erlaubte Nutzung hinausgeht, müssen Sie die Erlaubnis direkt beim Urheberrechtsinhaber einholen. Eine Kopie dieser Lizenz können Sie unter <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> einsehen.

## Referenzen

1. Allison RL, Welby E, Khayrullina G, Burnett BG, Ebert AD (2022) Viraler Knockdown von GATA6 in SMA iPSC-abgeleiteten Astrozyten verhindert den Verlust von Motoneuronen und die Aktivierung von Mikroglia. *Glia* 70:989-1004. <https://doi.org/10.1002/glia.24153>
2. Barbour B, Brew H, Attwell D (1991) Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander



- (Ambystoma) *Netzhaut. J Physiol* 436:169-193. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018545>
3. Barik A, Li L, Sathyamurthy A, Xiong WC, Mei L (2016) Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J Neurosci* 36:9770-9781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-16.2016>
  4. Bay V, Butt AM (2012) Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* 60:651-660. <https://doi.org/10.1002/glia.22299>
  5. Bhat VD, Jayaraj J, Babu K (2022) RNA and neuronal function: the importance of post-transcriptional regulation. *Oxford Open Neuroscience* 1: <https://doi.org/10.1093/oons/kvac011>
  6. Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT (2006) Erhöhte Anfallsdauer und verlangsamte Kaliumkinetik bei Mäusen, denen Aquaporin-4 Wasserkanäle fehlen. *Glia* 53:631-636. <https://doi.org/10.1002/glia.20318>
  7. Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL, Kothary R (2010) Rho-Kinase-Inaktivierung verlängert das Überleben eines intermediären SMA-Mausmodells. *Hum Mol Genet* 19:1468-1478. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq021>
  8. Bowerman M, Murray LM, Boyer JG, Anderson CL, Kothary R (2012) Fasudil verbessert das Überleben und fördert die Entwicklung der Skelettmuskulatur in einem Mausmodell der spinalen Muskelatrophie. *BMC Med* 10:24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-24>
  9. Branchu J, Biondi O, Chali F, Collin T, Leroy F, Mamchaoui K et al (2013) Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells. *J Neurosci* 33:4280-4294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2728-12.2013>
  10. Butchbach ME, Rose FF Jr, Rhoades S, Marston J, McCrone JT, Sinnott R et al (2010) Wirkung der Ernährung auf das Überleben und den Phänotyp eines Mausmodells für spinale Muskelatrophie. *Biochem Biophys Res Commun* 391:835-840. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.148>
  11. Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, Weiss JH (2000) AMPA-Expositionen induzieren eine mitochondriale Ca(2+)-Überlastung und ROS-Erzeugung in spinalen Motoneuronen in vitro. *J Neurosci* 20:240-250
  12. Chaytow H, Huang YT, Gillingwater TH, Faller KME (2018) The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 75:3877-3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2849-1>
  13. Cordeiro JL, Neves JD, Nicola F, Vizuite AF, Sanches EF, Goncalves CA et al (2022) Arundic Acid (ONO-2506) Attenuates Neuroinflammation and Prevents Motor Impairment in Rats with Intracerebral Hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* 42:739-751. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00964-6>
  14. Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT et al (2021) Onasemnogene APOB gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 20:284-293. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00001-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00001-6)
  15. Deguise MO, Chehade L, Tierney A, Beauvais A, Kothary R (2019) Low fat diets increase survival of a mouse model of spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 6:2340-2346. <https://doi.org/10.1002/acn3.50920>
  16. Dennys CN, Sierra-Delgado JA, Ray SS, Hartlaub AM, Roussel FS, Rodriguez Y, Meyer K (2021) In vitro Modeling for Neurological Diseases using Direct Conversion from Fibroblasts to Neuronal Progenitor Cells and Differentiation into Astrocytes. *J Vis Exp*: Doi <https://doi.org/10.3791/62016>
  17. Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molekulare Mechanismen der Exzitotoxizität und ihre Bedeutung für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen. *Acta Pharmacol Sin* 30:379-387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>

18. Eroglu C, Barres BA (2010) Regulierung der synaptischen Konnektivität durch Glia. *Nature* 468:223-231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>
19. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J et al (2017) Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377:1723-1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
20. Fonnum F (1984) Glutamat: ein Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren. *J Neurochem* 42:1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb09689.x>
21. Frasca A, Aalbers M, Frigerio F, Fiordaliso F, Salio M, Gobbi M et al (2011) Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity. *Neurobiol Dis* 43:507-515. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.024>
22. Freigang M, Steinacker P, Wurster CD, Schreiber-Katz O, Osmanovic A, Petri S, Koch JC, Rostasy K, Huss A, Tümani H et al (2022) Glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid of patients with spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. Doi <https://doi.org/10.1002/acn3.51645>
23. Genabai NK, Ahmad S, Zhang Z, Jiang X, Gabaldon CA, Gangwani L (2015) Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 24:6986-7004. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv401>
24. Hagenacker T, Wurster CD, Gunther R, Schreiber-Katz O, Osmanovic A, Petri S et al (2020) Nusinersen in adults with 5q spinal muscular atrophy: a non-interventional, multicentre, observational cohort study. *Lancet Neurol* 19:317-325. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30037-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30037-5)
25. Hensel N, Baskal S, Walter LM, Brinkmann H, Gernert M, Claus P (2017) ERK und ROCK interagieren funktionell in einem Signalnetzwerk, das bei spinaler Muskelatrophie kompensatorisch hochreguliert ist. *Neurobiol Dis* 108:352-361. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.09.005>
26. Hensel N, Kubinski S, Claus P (2020) The Need for SMN-Independent Treatments of Spinal Muscular Atrophy (SMA) to Complement SMN-Enhancing Drugs. *Front Neurol* 11:45. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00045>
27. Hensel N, Ratzka A, Brinkmann H, Klimaschewski L, Grothe C, Claus P (2012) Analysis of the fibroblast growth factor system reveals alterations in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 7: e31202 Doi <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031202>
28. Hensel N, Stockbrugger I, Rademacher S, Broughton N, Brinkmann H, Grothe C et al (2014) Bilateral crosstalk of rho- and extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) pathways is confined to an unidirectional mode in spinal muscular atrophy (SMA). *Cell Signal* 26:540-548. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.027>
29. Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B et al (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1604-1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
30. Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH et al (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24:66-70. <https://doi.org/10.1038/71709>
31. Hsu MS, Lee DJ, Binder DK (2007) Mögliche Rolle des glialen Wasserkanals Aquaporin-4 bei Epilepsie. *Neuron Glia Biol* 3:287-297. <https://doi.org/10.1017/S1740925X08000112>
32. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF et al (2010) Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 24:1634-1644. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>
33. Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF et al (2011) Peripheral SMN restoration is essential for long-term res- cue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 478:123-126. <https://doi.org/10.1038/nature10485>

34. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamat-vermittelte Exzitoxizität und Neurodegeneration bei der Alzheimer-Krankheit. *Neurochem Int* 45:583-595. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>
35. Kanai Y, Hediger MA (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* 479:237-247. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.073>
36. Karki P, Hong P, Johnson Jr, Pajarillo E, Son DS, Aschner M et al (2018) Arundic Acid Increases Expression and Function of Astrocytic Glutamate Transporter EAAT1 Via the ERK, Akt, and NF-kappaB Pathways. *Mol Neurobiol* 55:5031-5046. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0709-x>
37. Kiebler MA, Scheiffele P, Ule J (2013) What, where, and when: the importance of post-transcriptional regulation in the brain. *Front Neurosci* 7:192. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00192>
38. Krampfl K, Schlesinger F, Wolfes H, Dengler R, Bufer J (2001) Funktionelle Vielfalt rekombinanter humaner AMPA-Typ-Glutarezzeptoren: mögliche Auswirkungen auf die selektive Verletzbarkeit von Motoneuronen. *J Neurol Sci* 191:19-23. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00626-8](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00626-8)
39. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulet P, Viollet L et al (1995) Identifizierung und Charakterisierung eines für spinale Muskelatrophie bestimmenden Gens. *Cell* 80:155-165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
40. Lefebvre S, Bulet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A et al (1997) Korrelation zwischen Schweregrad und SMN-Proteinspiegel bei spinaler Muskelatrophie. *Nat Genet* 16:265-269. <https://doi.org/10.1038/ng0797-265>
41. Leo M, Schmitt LI, Fleischer M, Steffen R, Osswald C, Kleinschnitz C, Hagenacker T (2022) Induction of Survival of Motor Neuron (SMN) Protein Deficiency in Spinal Astrocytes by Small Interfering RNA as an In Vitro Model of Spinal Muscular Atrophy. *Cells* 11: Doi <https://doi.org/10.3390/cells11030558>
42. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) Ein einzelnes Nukleotid im SMN-Gen reguliert das Spleißen und ist verantwortlich für spinale Muskelatrophie. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6307-6311. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>
43. Lunn MR, Wang CH (2008) Spinale Muskelatrophie. *Lancet* 371:2120-2133. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6)
44. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D (2019) Astrozyten erhalten die Glutamat-Homöostase im ZNS aufrecht, indem sie das Gleichgewicht zwischen Glutamataufnahme und -abgabe kontrollieren. *Cells* 8: Doi <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
45. Martinez TL, Kong L, Wang X, Osborne MA, Crowder ME, Van Meerbeke JP et al (2012) Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *J Neurosci* 32:8703-8715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0204-12.2012>
46. Masson R, Mazurkiewicz-Beldzinska M, Rose K, Servais L, Xiong H, Zanoteli E et al (2022) Safety and efficacy of risdiplam in patients with type 1 spinal muscular atrophy (FIREFISH part 2): secondary analyses from an open-label trial. *Lancet Neurol* 21:1110-1119. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00339-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00339-8)
47. McGivern JV, Patitucci TN, Nord JA, Barabas MA, Stucky CL, Ebert AD (2013) Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia* 61:1418-1428. <https://doi.org/10.1002/glia.22522>
48. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6-18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
49. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Lehman KJ, McCollly M, Lowes LP, Alfano LN et al (2021) Five-Year Extension Results of the Phase 1 START Trial of Onasemnogene Apeparovvec in Spinal Muscular

- Atrophie. JAMA Neurol 78:834-841. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.1272>
50. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM et al (2018) Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 378:625-635. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710504>
  51. Mercuri E, Deconinck N, Mazzone ES, Nascimento A, Oskoui M, Saito K et al (2022) Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 21:42-52. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00367-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00367-7)
  52. Meyer T, Maier A, Uzelac Z, Hagenacker T, Gunther R, Schreiber-Katz O et al (2021) Treatment expectations and perception of therapy in adult patients with spinal muscular atrophy receiving nusinersen. *Eur J Neurol* 28:2582-2595. <https://doi.org/10.1111/ene.14902>
  53. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY (2003) Astrozyten akkumulieren A beta 42 und führen zu astrozytären Amyloid-Plaques in Alzheimer-Gehirnen. *Brain Res* 971:197-209. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02361-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02361-8)
  54. Narver HL, Kong L, Burnett BG, Choe DW, Bosch-Marce M, Taye AA et al (2008) Nachhaltige Verbesserung von Mäusen mit spinaler Muskelatrophie, die mit Trichostatin A plus Ernährung behandelt wurden. *Ann Neurol* 64:465-470. <https://doi.org/10.1002/ana.21449>
  55. Nolle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tonges L, Gerhard R, Brinkmann H et al (2011) The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet* 20:4865-4878. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr425>
  56. Olabarria M, Noristani HN, Verkhatsky A, Rodriguez JJ (2010) Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58:831-838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
  57. Qu R, Yao F, Zhang X, Gao Y, Liu T, Hua Y (2019) SMN deficiency causes pain hypersensitivity in a mild SMA mouse model through enhancing excitability of nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Sci Rep* 9:6493. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43053-5>
  58. Riessland M, Ackermann B, Forster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L et al (2010) SAHA verbessert den SMA-Phänotyp in zwei Mausmodellen für Spinale Muskelatrophie. *Hum Mol Genet* 19:1492-1506. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq023>
  59. Rindt H, Feng Z, Mazzasette C, Glascock JJ, Valdivia D, Pyles N et al (2015) Astrozyten beeinflussen die Schwere der spinalen Muskelatrophie. *Hum Mol Genet* 24:4094-4102. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv148>
  60. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW et al (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80086-0)
  61. Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW (1993) Chronische Hemmung der Glutamataufnahme erzeugt ein Modell der langsamen Neurotoxizität. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6591-6595. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6591>
  62. Schellino R, Boido M, Borsello T, Vercelli A (2018) Pharmacological c-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK) Pathway Inhibition Reduces Severity of Spinal Muscular Atrophy Disease in Mice. *Front Mol Neurosci* 11:308. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00308>
  63. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrozyten: Biologie und Pathologie. *Acta Neuropathol* 119:7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
  64. Stark DT, Bazan NG (2011) Synaptische und extrasynaptische NMDA-Rezeptoren modulieren auf unterschiedliche Weise die neuronale Cyclooxygenase-2-Funktion, Lipidperoxidation und Neuroprotektion. *J Neurosci* 31:13710-13721. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3544-11.2011>
  65. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S et al (2013) Abeta induziert astrozytäre Glutamatfreisetzung, extrasynaptische NMDA-Rezeptoraktivierung und synaptischen Verlust. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2518-2527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>
  66. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K et al (1997) Epilepsie und Verschlimmerung von Hirnschäden bei Mäusen, denen der Glutamattransporter GLT-1 fehlt. *Science* 276:1699-1702. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1699>
  67. Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H (2008) Multiple therapeutische Effekte von Valproinsäure in Mäusen mit spinaler Muskelatrophie. *J Mol Med (Berl)* 86:1243-1254. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0388-1>
  68. Van den Bosch L, Van Damme P, Vleminckx V, Van Houtte E, Lemmens G, Missiaen L et al (2002) Ein alpha-Mercaptoacrylsäure-Derivat (PD150606) hemmt den selektiven Tod von Motoneuronen durch Hemmung des Kainat-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms und nicht durch Calpain-Hemmung. *Neuropharmakologie* 42:706-713. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00010-2)
  69. Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N et al (2007) Verfeinerte Charakterisierung der Expression und Stabilität der SMN-Genprodukte. *Am J Pathol* 171:1269-1280. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070399>
  70. Yanagisawa M, Aida T, Takeda T, Namekata K, Harada T, Shinagawa R, Tanaka K (2015) Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis* 6:e1693 Doi <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.45>
  71. Yeo CJJ, Darras BT (2020) Overturning the Paradigm of Spinal Muscular Atrophy as Just a Motor Neuron Disease. *Pediatr Neurol* 109:12-19. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.003>

**Anmerkung des Herausgebers** Springer Nature bleibt neutral in Bezug auf juristische Ansprüche in veröffentlichten Karten und institutionellen Zugehörigkeiten.