

Die Rezeptortyrosinkinase cMet reguliert die mTOR- abhängige Gephyrinclusterung an inhibitorischen Synapsen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Pauline Jeckel
aus Schlüchtern

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	11.02.2021
Stellvertretender Dekan:	Prof. Dr. József Fortágh
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ulrich Rothbauer
2. Berichterstatter:	Apl. Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Die Rezeptortyrosinkinase cMet reguliert die mTOR-abhängige Gephyrinclusterung an inhibitorischen Synapsen“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe von bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen den 14.12.2020

Pauline Jeckel

Denkend häng ich im Kopf zusammen, was vielleicht auch sonst zusammenhängt.

-Manfred Hinrich-



Paetrick Schmidt

1 DANKSAGUNG

Zu aller erst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit bedanken. Drei Jahre lang hast du mich bei jeglichen Problemen und Fragen unterstützt und mir mit kompetentem Fachwissen zur Seite gestanden. Vielen Dank für die motivierenden Worte, die mir geholfen haben persönliche Grenzen zu überwinden und die facettenreichen Diskussion. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken an der FENS in Berlin teilzunehmen sowie den Forschungsausflug nach Israel.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Ulrich Rothbauer bedanken, der sich in regelmäßigen Abständen die Zeit genommen hat den Zwischenstand meiner Doktorarbeit zu begutachten und zu diskutieren. Vielen Dank für den fachlichen Input.

Vielen Dank an Dr. Martin Kriebel, der immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme hatte. Deine hilfsbereite Art gab mir das Gefühl jedes wissenschaftliche Problem, und sei es noch so klein, immer diskutieren und auf irgendeine Art und Weise lösen zu können. Deine positiven, motivierenden Worte haben mich in der einen oder anderen wissenschaftlichen Krisenzeit wiederaufgebaut.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Katja Kühs, die mich mit kleinen, innovativen Ideen während des Tierversuchs technisch unterstützt hat und mir mit unerbittlichen Bemühungen geholfen hat die Neuronenpräparation zu optimieren. Mit deiner lockeren Art hast du mir die Zuversicht gegeben die Tierversuche meistern zu können. Deine aufmunternden Worte haben mich nicht nur moralisch unterstützt, sondern mir geholfen mit den Herausforderungen meiner Doktorarbeit besser zurechtzukommen.

Die lustigen und schönen Momente mit Nicole Anderle, Jessica Pfannstiel, Sabrina Vogel, Miriam Reh, Mong Wrong Lee, Anna-Lena Keller, Marius Busche und Sören Segan werde ich nie vergessen. Ich bin euch dankbar dafür, dass ihr meine Launen ertragen und mich auch nach deprimierenden Experimenten wieder aufgemuntert habt. Danke an Roswitha Fischer, die meine Arbeitszeit am IMARIS-Rechner mit lustigen Unterhaltungen verbessert hat. Jede Kaffeepause mit euch allen hat den Arbeitsalltag aufgelockert und ein bisschen besser gemacht. Danke für eure unermüdliche Hilfsbereitschaft. Ohne euch wäre meine Zeit am NMI nicht so lustig gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Ricarda Stock, die während allen Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit an meiner Seite stand und mich drei Jahre lang begleitet und unterstützt hat; danke für deine aufbauenden Worte, dass ich mich dir anvertrauen konnte und wir diesen Weg zusammen gegangen sind.

Danke an Yannick Maier, der mich immer unterstützt und aufgefangen hat, wenn ich mal wieder eine wissenschaftliche Talfahrt unternommen habe. Du hast mir stets geholfen frischen Mut zu fassen und immer an mich geglaubt.

Zum Schluss möchte ich meiner ganzen Familie danken. Ihr seid immer für mich da und habt mich in allen Entscheidungen während meiner studentischen Laufbahn unterstützt, sodass ich letztendlich diese Doktorarbeit bestreiten konnte!

2 INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung.....	V
1 Danksagung.....	VII
2 Inhaltsverzeichnis.....	VIII
3 Abbildungsverzeichnis.....	XI
4 Tabellenverzeichnis.....	XII
5 Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
6 Zusammenfassung	XV
7 Einleitung	1
7.1 Der Hippocampus.....	1
7.1.1 Funktionen	1
7.1.2 Aufbau, Struktur und Verschaltung.....	2
7.1.3 Der Hippocampus als Ausgangspunkt Für Erkrankungen.....	3
7.2 Neuronale Zelltypen des Gyrus Dentatus.....	4
7.2.1 Synaptische Verschaltung	5
7.3 Rezeptortyrosinkinasen.....	10
7.3.1 Rezeptortyrosinkinasen zur Regulation von Interneuronkonnektivität	10
7.3.2 cMet	10
7.4 Der mTOR Signalweg	11
7.5 Die endosomalen Kompartimente	13
7.5.1 Struktur und Funktionen der endosomalen Kompartimente.....	13
8 Zielsetzung	14
9 Material und Methoden.....	15
9.1 Materialien	15
9.2 Molekularbiologische Methoden	20
9.2.1 Transformation.....	20
9.2.2 Messung der DNA-Konzentration.....	20
9.2.3 Restriktionsverdau	20
9.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	20
9.3 Zellkultur	21
9.3.1 Beschichtung von Zellkulturplatten.....	21
9.3.2 Präparation primärer Neurone.....	21
9.3.3 Transfektion	21

9.3.4	Lentivirale Produktion	22
9.3.5	Titerbestimmung.....	23
9.3.6	Transduktion	23
9.3.7	HGF Stimulation	23
9.3.8	Rapamycin Behandlung.....	23
9.3.9	Immunzytochemie: Primäre Neurone.....	24
9.4	Tierversuche	24
9.4.1	Stereotaktische Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte.....	24
9.4.2	Transkardiale Perfusionsfixierung.....	26
9.4.3	Vibratomschnitte.....	26
9.4.4	Immunhistochemie	27
9.5	Auswertungsroutinen.....	27
9.5.1	Mikroskopie/ Auswertung der Immunhistochemie/ Immuncytochemie.....	27
9.5.2	Statistik.....	28
10	Ergebnisse	29
10.1	Die Rezeptortyrosinkinase cMet ist beteiligt an der Regulation inhibitorischer Synapsen	29
10.1.1	cMet ist in räumlicher Nähe zu den postsynaptischen Markern Gephyrin und PSD95.....	29
10.1.2	mRNA Expression von cMet nach Knockdown reduziert <i>in vitro</i>	32
10.1.3	Reduktion der RTK cMet auf Proteinebene <i>in vitro</i>	33
10.1.4	Knockdown der RTK bewirkt eine Reduktion der Gephyrinclusterung <i>in vitro</i>	34
10.1.5	Knockdown der RTK cMet bewirkt eine Reduktion von cMet auf Proteinebene <i>in vivo</i>	36
10.1.6	Knockdown der RTK cMet bewirkt eine Reduktion von inhibitorischen Synapsen <i>in vivo</i>	38
10.1.7	Der cMet Rezeptor kann <i>in vitro</i> durch seinen spezifischen Liganden HGF induziert werden...	40
10.1.8	HGF Stimulation <i>in vitro</i> bewirkt eine gesteigerte Gephyrinclusterung, während PHA zu einer Reduktion der Gephyrinclusterung führt.....	42
10.1.9	Die HGF induzierte Gephyrinclusterung ist mTOR- und Zeit-abhängig	44
10.2	TSC2 beeinflusst die Gephyrinclusterung	47
10.2.1	Reduktion von TSC2 nach Knock-down auf Proteinebene <i>in vitro</i>	47
10.2.2	Knock-down von TSC2 bewirkt eine gesteigerte Gephyrinclusterung <i>in vitro</i>	49
10.2.3	Reduktion von TSC2 auf Proteinebene nach knock-down <i>in vivo</i>	51
10.2.4	Knock-down von TSC2 im Gyrus Dentatus bewirkt eine Reduktion synaptischer Marker <i>in vivo</i>	52
10.2.5	Knockdown von TSC2 im Gyrus Dentatus inhibiert die Phosphorylierung der P70 S6 Kinase54	

10.3	Die Überexpression des endosomalen Markers Rab5A führt zu einer Reduktion von inhibitorischen Synapsen	55
10.3.1	Überexpression von Rab5A führt zu einer Reduktion der Gephyrinclusterdichte <i>in vitro</i>	55
10.3.2	Überexpression von Rab5A führt zu einer Reduktion der S6 Kinase Phosphorylierung <i>in vitro</i>	57
10.3.3	Überexpression von weiteren Rab Proteinen hat keinen Effekt auf die Gephyrinclusterung <i>in vitro</i>	58
11	Diskussion.....	60
11.1.1	cMet als Regulator synaptischer Plastizität.....	60
11.1.2	TSC2 als Schlüsselregulator synaptischer Stabilisierungsproteine	63
11.1.3	TSC2- ein facettenreiches Protein im Kontext von Autismus-Spektrum Störungen	65
11.1.4	Das endosomale Kompartiment als Schauplatz der Gephyrintranslokation.....	66
11.1.5	Drei verschiedene Blickwinkel auf ein Protein und eine Krankheit.....	69
12	Ausblick	71
13	Anhang	73
13.1.1	Übersicht der Injektionen in den Gyrus Dentatus der Ratte	74
13.1.2	Einzeldaten der Stereotaktischen Injektion des cMet KD in den DG	77
13.1.3	Einzeldaten der Stereotaktischen Injektion des TSC2 KD in den DG	78
14	Literaturverzeichnis.....	79

3 ABILUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schichtung und Kompartimente des Hippocampus	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer exzitatorischen Synapse	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer inhibitorischen Synapse	7
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Rezeptortyrosinkinase cMet.....	10
Abbildung 5: cMet Immunfluoreszenz im Gyrus Dentatus der Ratte	29
Abbildung 6: <i>Status quo</i> Analyse der Lokalisation von cMet und den Markern Gephyrin und PSD95	31
Abbildung 7: cMet mRNA Gehalt nach Transduktion corticaler primärer Neurone	32
Abbildung 8: Immuncytochemische Quantifizierung des cMet Signals nach Knockdown <i>in vitro</i>	33
Abbildung 9: Immuncytochemische Quantifizierung synaptischer Marker nach Knockdown <i>in vitro</i>	35
Abbildung 10: Exemplarische Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte	36
Abbildung 11: Immuncytochemische Quantifizierung des cMet Signals nach Knockdown <i>in vivo</i>	37
Abbildung 12: Effekt des cMet Knockdown auf synaptische Marker im Gyrus Dentatus der Ratte	40
Abbildung 13: Effekt von HGF/ PHA Behandlung auf cMet Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen	41
Abbildung 14: Effekt einer 24h HGF, PHA-66572 und PHA-66572/HGF Stimulation hippocampaler Neurone auf Gephyrin <i>in vitro</i>	43
Abbildung 15: Effekt von HGF, PHA-66572 und PHA-66572/HGF Stimulation hippocampaler Neurone auf S6 Kinase Phosphorylierung <i>in vitro</i>	45
Abbildung 16: Effekt von HGF und Rapamycin auf Gephyrinclusterung in hippocampalen Neuronen.....	47
Abbildung 17: Immuncytochemische Quantifizierung des TSC2 Signals nach Knockdown <i>in vitro</i>	48
Abbildung 18: Immuncytochemische Quantifizierung der synaptischen Marker nach TSC2 Knockdown <i>in vitro</i>	50
Abbildung 19: Immuncytochemische Quantifizierung des TSC2 Signals nach Knockdown <i>in vivo</i>	51
Abbildung 20: TSC2 knockdown im Gyrus Dentatus der Ratte verursacht eine Reduktion synaptischer Markerproteine.....	54
Abbildung 21: TSC2 Knockdown <i>in vivo</i> reduziert die Phosphorylierung der S6 Kinase	55
Abbildung 22: Effekt von Rab5 Varianten auf die Gephyrinclusterung in hippocampalen Neuronen.....	56
Abbildung 23: Effekt von RAB5A CA Überexpression auf S6 Kinase Phosphorylierung	57
Abbildung 24: Effekt von Kontroll Rab Varianten auf die Gephyrinclusterung.....	59
Abbildung 25: schematisch, hypothetische Darstellung der cMet Signaling Kaskade	70
Abbildung 26: Lentiviraler Expressionsvektor	73
Abbildung 27: Injektionstreffer der cMet/TSC2 injizierten lentiviralen Konstrukte in den Gyrus Dentatus von 3 Monate Ratte	76
Abbildung 28: Einzeldaten der stereotaktischen cMet Knockdown Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte.....	77
Abbildung 29: Einzeldaten der stereotaktischen TSC2 Knockdown Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte.....	78

4 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Abkürzungen</i>	XIII
<i>Tabelle 2: Labormaterialien</i>	15
<i>Tabelle 3: Chemikalien und Antibiotika</i>	16
<i>Tabelle 4: Medikamente</i>	17
<i>Tabelle 5: Antikörper</i>	17
<i>Tabelle 6: Maschinen</i>	18
<i>Tabelle 7: Kits</i>	18
<i>Tabelle 8: Primer</i>	19
<i>Tabelle 9: Injektionskoordination in den Gyrus Dentatus einer adulten Ratte</i>	25

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Abkürzungen

AIS	Axon-Initialsegments
AMP	Ampicillin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANOVA	Analysis of Variance
ASD	Autism Spectrum Disorder
ATP	Adenosintriphosphat
BMB	Blocking Reagenz
CA	Cornu Ammonis
CA	Constitutiv aktiv
Ca²⁺	Calcium-Ion
CamKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
Cb	Collybistin
CKK	Cholecystokinin
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3/5	Carbocyanin 3/5
DG	Gyrus Dentatus
DIV	Days in vitro
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nukleotid Exchange Factors
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
h	Stunde
H₂O	Wasser
HEK	human embryonic kidney Zellen
HGF	hepatocytenwachstumsfaktor
HICAP	hilar commissural-associational pathway related cells
HIPP	hilar perforant path-associated
HS	Hemisphäre
iPSC	Induced Pluripotent Stemcells
kg	Kilogramm
KIF5	Mikrotubuli- assoziierten Proteinen wie Moto-Protein Kinesin
l	Liter
LAMP	Lysosom assoziierte Membran-Protein
LTP	Long term potentiation
LTD	Long term depression
MAGUK	membran-assozierten Guanylat-Kinasen
MAP2	Mikrotubuli-assoziierte Protein2
min	Minuten

miRNA	micro Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
MOPP	molecular lyaer perforant path associated cell
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NL2	Neurologin 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PSD95	postsynaptic density protein 95
Rab	Ras-assozierten Binde-Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S6K	S6 Kinase beta-1
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TrK	Tropomyosin Receptor Kinase
VGAT	vesikulärer GABA Transporter
VGLuT	vesikulärer Glutamat-Transporter
wt	Wildtyp

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der Literatur sind bereits mehrere Rezeptortyrosinkinasen beschrieben worden, die an der Regulation inhibitorischer Synapsen beteiligt sind. Nicht nur in einem siRNA basierten Screen, sondern auch durch elektrophysiologische Untersuchungen ist die Rezeptortyrosinkinase cMet im Zusammenhang mit der Regulation inhibitorischer Synapsen in Erscheinung getreten. cMet wurde bereits hinlänglich im Kontext der Tumorbilogie beschrieben und ist erst kürzlich in den Fokus der Neurobiologie gerückt.

In dieser Arbeit wurde die Relevanz von cMet für die synaptische Verschaltung sowohl *in vitro*, in dissoziierten hippocampalen Neuronen, als auch *in vivo*, im Gyrus Dentatus der Ratte, gezeigt. In beiden Systemen konnte bestätigt werden, dass cMet notwendig für die Bildung der inhibitorischen Gerüststruktur ist. In weiterführenden *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass cMet hinreichend ist, um eine mTOR-abhängige Gephyrinclusterung zu induzieren, die durch den spezifischen mTOR Inhibitor Rapamycin gehemmt werden kann.

TSC2 ist der Negativregulator von mTOR. Nach TSC2 KD *in vitro* wurde eine erhöhte Clusterdichte von Gephyrin festgestellt. In den *in vivo* Untersuchungen wurde eine mTOR-abhängige Verringerung synaptischer Markerprotein nachgewiesen. TSC2 ist demnach nicht nur für die Regulation exzitatorischer, sondern auch inhibitorischer synaptischer Verschaltungen relevant.

In einem weiteren Experiment wurde in die Konversion der endosomalen Kompartimente eingegriffen um den Ursprungsort der Translokation von Gephyrin besser beschreiben zu können. Durch die Transfektion hippocampaler Neurone mit der konstitutiv aktiven Varianten des frühen endosomalen Markers Rab5A wurde die mTOR Aktivität inhibiert und die Gephyrinclusterung reduziert.

Diese Doktorarbeit bestätigt, dass cMet, TSC2 und die endosomalen Kompartimente sich nicht nur in der Relevanz für Autismus Erkrankungen einen, sondern auch einen Einfluss auf die inhibitorische synaptische Verschaltung haben.

7 EINLEITUNG

Das menschliche Gehirn ist die Steuerzentrale des Körpers. Die Integration und Verarbeitung unterschiedlichster Sinneseindrücke der Umgebung und des Körpers selbst werden hier zentralisiert und prozessiert. Um diese enormen Leistungen aus Input, Prozessieren und Output gerecht zu werden haben sich im Laufe der Evolution vielerlei Strukturen und Verknüpfungen entwickelt und dem Gehirn seine Morphologie verliehen. Den neusten Schätzungen nach zu Folge besteht das menschliche Gehirn aus 100^{15} Neuronen [2, 3]. Pro Neuron werden etwa 10^4 Synapsen, funktionelle Einheiten der interneuronalen Kommunikation und Signalweiterleitung, ausgebildet. Synapsen sind allerdings keine stabilen Verbindungen, sondern höchst plastisch. In dieser Eigenschaft liegt die unerschöpfliche Fähigkeit des Gehirns beispielsweise zu Lernen und Gefühle zu assoziieren. Für diese Leistungen ist im Besonderen das limbische System verantwortlich.

Das limbische System ist als Teil des Gehirns die zentrale Funktionseinheit für die Verarbeitung von Emotionen und besteht aus unterschiedlichen Gehirnarealen. Die einzelnen Bereiche beschreiben das System nicht durch ihre Topografie, sondern über ihre Funktionalität. Sie sind unter anderem wichtig für Lernprozesse und das Abspeichern von Gedächtnisinhalten. Der Mandelkernkomplex, die Amygdala, ist das integrative Zentrum der emotionalen Verarbeitung und assoziiert Erlebnisse mit Emotionen. Eingänge erhält die Amygdala aus dem vorgeschalteten Thalamus, aber auch dem Präfrontalkortex oder dem Hippocampus [4]. Der Präfrontalcortex übernimmt eine gewisse Form der Kontrollfunktion, analysiert Emotionen im Kontext des Gesamtbildes und schlussfolgert eine adäquate Handlung. Kommt es beispielsweise zu einer Läsion in diesem Areal treten Störungen in der Persönlichkeit auf, die sich durch unpassendes Verhalten, Impulsivität und abwechselnde Euphorie und Antriebslosigkeit auszeichnen [5]. Der Austausch mit dem Hippocampus hingegen schafft ein emotionales Gedächtnis und speichert angstbehaftete Ereignisse ab.

7.1 Der Hippocampus

7.1.1 FUNKTIONEN

Die Hauptfunktion des Hippocampus ist die sogenannte Gedächtniskonsolidierung. Sie beschreibt den Mechanismus, der es ermöglicht, zu Lernen und Erinnerungen zu schaffen. Zum Erhalt temporärer Erinnerungen werden die Informationen falls notwendig an das Langzeitgedächtnis „weitergegeben“, welches in den kortikalen Arealen gebildet wird. Darüber hinaus ist der Hippocampus an der räumlichen Orientierung beteiligt. Zu diesem Zweck wurden im Gehirn besondere, hochspezialisierte Zellen entwickelt, die räumliche Abstände, Geschwindigkeit und die Eigenbewegung in Bezug zueinander setzen. Eine weitere Funktion ist die emotionale Verknüpfung mit Gedächtnisinhalten.

7.1.2 AUFBAU, STRUKTUR UND VERSCHALTUNG

Der Hippocampus zieht sich paarig angelegt durch das Telencephalon. Der Großteil des Hippocampus liegt im Temporallappen und zieht sich bogenförmig unter dem Corpus callosum über den Fornix in rostrale Richtung. Er ist konserviert bei den Säugetieren angelegt und zeichnet sich durch seine mannigfaltigen Verknüpfungen zu anderen Bereichen des Gehirns aus. Der Querschnitt des Hippocampus kann in drei Subeinheiten untergliedert werden: den Gyrus Dentatus, die Cornu Ammonis und das Subiculum. Vereinfacht verläuft der eingehende Informationsfluss des Hippocampus vom Gyrus Dentatus über das Cornu ammonis (CA) und Subiculum bis zum Fornix. Der Fornix bezeichnet eine Faserstruktur, welche sich aus Fimbrien beider hippocampalen Hemisphären bildet und als Projektionsbahn zwischen dem Hippocampus und dem Corpora mammillaria gilt. In der CA Region erkennt man am deutlichsten die Schichtung der Zellen im Hippocampus. In dem Stratum oriens, oder auch Korbzellschicht genannt, liegen die namensgebenden Korbzellen.

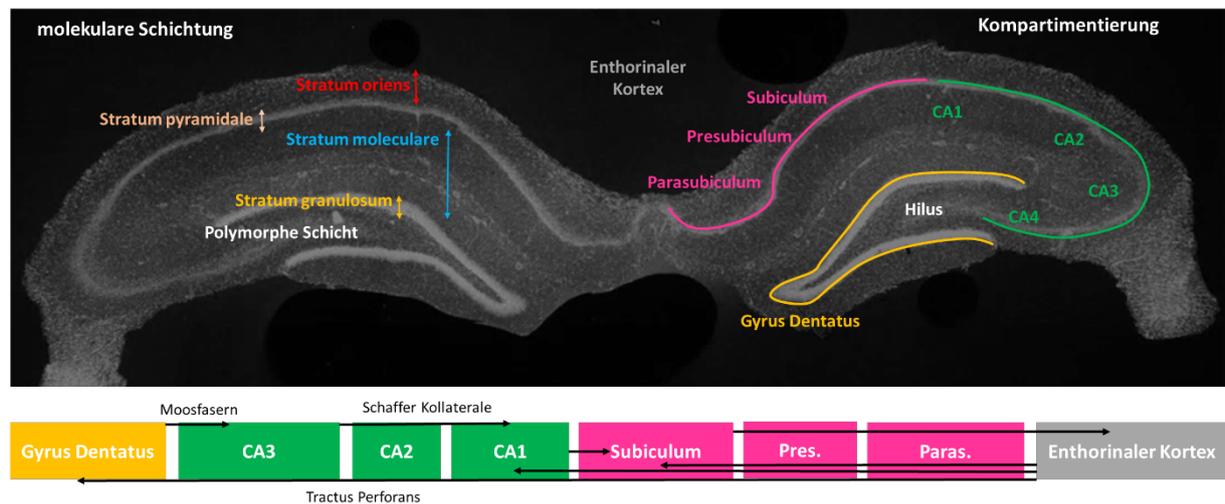


Abbildung1: Schichtung und Kompartimente des Hippocampus
 Die Darstellung eines Coronalchnitts (Kernfärbung (Hoechst) in weiß) des Hippocampus der Ratte zeigt links die molekulare Schichtung im Hippocampus und rechts die unterschiedlichen Kompartimente. Unterhalb des Schnitts ist die Verschaltung der verschiedenen Kompartimente über die jeweiligen Fasertrakte schematisch abgebildet. CA= Cornu ammonis; Pres.=Presubiculum; Paras.=Parasubiculum.

Unterhalb dieser Zellen gliedert sich das Stratum pyramidale an, das hauptsächlich aus großen, glutamatergen Pyramidenzellen besteht. Im Inneren der Windung des Hippocampus ist das Stratum moleculare zu finden. Dies ist eine eher zellarme Schicht, die vor allem Interneurone enthält, welche die Verschaltung und Interaktion der Körner- und Pyramidenzellen modulieren. An Hand der Dichte und Lokalisation der Somata in der Cornu ammonis lässt sich der Hippocampus sehr gut gliedern, so ergeben sich die Regionen CA1-CA4. Während der Gyrus Dentatus die CA4 Region umgibt, geht die CA1 Region in das Subiculum über.

Ähnlich wie die CA Regionen ist auch im Gyrus Dentatus eine Schichtung der Zellen zu finden. Das Stratum granulosum des Gyrus Dentatus, in dem sich die Körnerzellen befinden, ist äquivalent zur Schicht der Pyramidenzellen des Stratum pyramidale des CA. Oberhalb liegt das Stratum moleculare, hier liegen die Dendriten der Körnerzellen sowie modulierende Interneurone. Innerhalb des Gyrus Dentatus befindet sich der Hilus mit der polymorphen Schicht. Er umfasst den Bereich der Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern. Auch in diesem Bereich lassen sich modulierende Interneurone finden.

Der Hippocampus erhält seine Afferenzen aus wichtigen Teilen des Gehirns, dem Thalamus, dem Gyrus cinguli, dem Septum und bereits prozessierten Input aus dem Neocortex. Diese Eingänge gelangen über den enthorinalen Cortex über den Tractus perforans direkt in den Gyrus Dentatus. Der enthorinale Cortex liegt medial am Lobus cerebri, dem Großhirnlappen, an. In diesem Kontext ist er maßgeblich beteiligt an der Gedächtnisbildung. Kommt es zu pathologischen Veränderungen im enthorinalen Cortex können Störungen bei der Gedächtnisbildung entstehen. Hier treten auch die frühesten Läsionen im Fall einer Alzheimer Erkrankung auf, weswegen dieses Areal besonders wichtig in der Früherkennung ist.

Die Verschaltung innerhalb des Hippocampus verläuft vom Tractus Perforans auf das Stratum Granulosum. Die Axone der darin liegenden Körnerzellen ziehen als Moosfasern in Richtung der CA3 Region. Über die Schaffer-Kollaterale werden die neuronalen Signale weiter in Richtung CA1 transportiert. Die CA1 Region ist verbunden mit dem Subiculum, die Hauptausgangsstruktur des Hippocampus. Von hier aus werden Efferenzen unter anderem zum medialen Präfrontalkortex und anderen Subkortikalen Strukturen gesendet.

7.1.3 DER HIPPOCAMPUS ALS AUSGANGSPUNKT FÜR ERKRANKUNGEN

Diverse Bereiche des Gehirns konnten in zurückliegenden Studien mit Angsterkrankungen in Verbindung gebracht werden. Darunter sind beispielsweise die Amygdala, der Nucleus Accumbens, Hirnstammkerne, präfrontale Regionen und der Hippocampus [6]. Besonders der Hippocampus spielt in Angsterkrankungen und posttraumatische Belastungsstörungen eine zentrale Rolle [7]. Hippocampale Dysfunktionen führen zu einem verstärkten Vermeidungs-Verhalten und sind damit Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Angsterkrankung [1, 8]. Da der Hippocampus die Schaltstelle zwischen Lang- und Kurzzeitgedächtnis ist, kann es bei entsprechenden Läsionen zu einer fehlerhaften Speicherung von neuen Informationen kommen. Läsionen können einerseits Konsequenzen des Älterwerdens sein und andererseits das Resultat neurodegenerativer Erkrankungen. Die Informationsverarbeitung im Gehirn ist abhängig von der Funktionalität sogenannter Interneurone. Sie machen etwa 10-15% der gesamten neuronalen Population aus [9]. Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass eine fehlregulierte Inhibition im Hippocampus eine signifikante Prävalenz für Angsterkrankungen in Mensch und Tier zur Folge hat. Nach derzeitigem Stand werden Angstpatienten mit Diazepam, einem Wirkstoff aus der Klasse der Benzodiazepine behandelt. Diazepam ist ein Agonist des inhibitorischen GABA_A (γ -Aminobuttersäure) -Rezeptors und verstärkt dessen Wirkung. Die Problematik des Wirkstoffes liegt darin, dass es häufig zu einer starken psychischen und körperlichen

Abhängigkeit kommt. Aus diesem Grund ist es wichtig die zellulären Signalwege, die an der Regulation dieses Rezeptors beteiligt sind, besser zu verstehen um mögliche neue therapeutische Ansätze zu finden.

Neben der Assoziation mit Angsterkrankungen, gibt es auch Evidenzen dafür, dass Autismus-Spektrum-Störungen mit Aberrationen im Hippocampus einhergehen. Einige Studien haben gezeigt, dass Autismus-Patienten Schwierigkeiten haben, zu erlernende Informationen zu organisieren [10]. Hippocampale Gedächtnisdefizite wurden hauptsächlich während des expliziten, aber nicht impliziten Abrufens von Gedächtnisinhalten beobachtet [11]. Während das implizite Gedächtnis automatisierte Handlungsabläufe abspeichert, beschreibt das explizite Gedächtnis das autobiografische Gedächtnis, welches verbal kommuniziert werden kann. Neben den veränderten Gedächtnisfunktionen haben quantitative Messungen zudem gezeigt, dass autistische Kinder auf Grundlage einer veränderten Morphologie des Hippocampus von gesunden Kindern unterschieden werden können [12].

7.2 Neuronale Zelltypen des Gyrus Dentatus

Neurone sind die Grundbausteine des Gehirns. Sie integrieren eingehende Signal und leiten diese über synaptische Verbindungen weiter. Über die Dendriten, welche Zellfortsätze aus dem Soma der Nervenzelle sind, werden Sinnesreize in eine Nervenzelle aufgenommen und weitergeleitet zum Perikaryon, welches den Bereich der Zelle beschreibt, der den Zellkern umhüllt. Von dort aus wird das elektrische Signal über das Axon bis hin zu den Axonterminalen weitergeleitet. Am synaptischen Endköpfchen wird das Signal auf ein nachgeschaltetes Neuron übertragen. Die Reizweiterleitung wird durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle sichergestellt, die an den Synapsen lokalisiert sind.

Interneurone hingegen können als Zwischenneurone bezeichnet werden. Sie nehmen keine direkten motorischen oder sensorischen Erregungen auf, sondern dienen der Verarbeitung der weitergeleiteten Signale. Sie verrechnen Eingänge aus verschiedensten Signalen und geben das modulierte Signal weiter.

Der Gyrus Dentatus umfasst ein dicht gepacktes Zellband, welches mit etwa $1,2 \times 10^6$ Zellen zu großen Teilen aus Körnerzellen besteht. Die Packdichte der Somata im Stratum Granulosum variiert entlang der septotemporalen Achse des Gyrus Dentatus [13]. Die Dendriten dieser Zellen liegen in dem Stratum moleculare und erhalten unterschiedliche, einkommende Signale. Die Axone dieser Körnerzellen projizieren über den Hilus in die CA3 Region. Die axonale Struktur kann dabei bis zu 3mm lang werden [14]. Die Körnerzellen des Gyrus Dentatus sind die einzigen sogenannten Projektionsneurone, die ein Axon ausbilden, das lang genug ist um als Moosfaser andere Teile des Hippocampus nämlich die CA3 Region zu innervieren. Unter anderem werden auch Mooszellen im Hilus adressiert, die die kontralaterale Innervation des Hippocampus ermöglichen.

Eine weitere Zellpopulation sind die Interneurone, welche sich wiederum in verschiedene Subpopulationen unterteilen lassen. Zu ihnen gehören GABAerge Korbzellen, welche angelehnt an ihre Bezeichnung eine korbartige Umhüllung mit Körnerzellen eingehen. Der Zellkörper dieser Zellen liegt im Stratum moleculare. Verschiedene Neuropeptide dienen als Marker für Korbzellen. So enthalten sie

beispielsweise Cholecystokin (CKK), was im Zusammenhang mit der Entstehung von Angststörungen steht [15]. Ein weiteres Protein der Korbzellen ist das calciumbindende Protein Parvalbumin, welches zur Hauptaufgabe hat intrazelluläre Calcium Dynamiken in Neuronen zu modulieren [16]. Oberhalb des Stratum granulosum, im Stratum moleculare liegt das Perikaryon der MOPP Zellen (molecular layer perforant path associated cell). Sie innervieren Zellen in ihrer Schicht. Ein weiterer Zelltyp im Stratum moleculare sind die Chandelier Zellen. Ihre Spezialisierung ist die Innervation des Axon-Initiaalsegments (AIS), also genau die Stelle, an der über die Entstehung eines Aktionspotentials entschieden wird. Die synaptische Verbindung, welche die Chandelier Zelle mit dem AIS eingeht, erinnert an einen Kronleuchter, was zur Namensgebung führte. Die Aufgabe des HIPP (hilar perforant path-associated) Interneurons ist die Modulation der dendritischen Verrechnung über eine cholinerge Neuromodulation [17, 18]. Einen weiteren Zelltyp stellen die HICAP (hilar commissural-associational pathway related cells) Zellen dar. Sie liegen in der polymorphen Schicht und projizieren durch das Stratum granulosum in das Stratum moleculare [19].

7.2.1 SYNAPTISCHE VERSCHALTUNG

Alle Synapsen lassen sich in drei Abschnitte gliedern. Sie bestehen aus der Präsynapse, dem etwa 20 µm großen synaptischen Spalt und der Postsynapse. Im präsynaptischen Teil befindet sich ein Reservoir mit Neurotransmitter gefüllten Vesikeln. Trifft ein Aktionspotential über das Axonterminal auf einen spannungsgesteuerten Ca^{2+} Kanal in der Präsynapse, kommt es zu einem Ca^{2+} Einstrom aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum. Ist das Aktionspotential vorüber, werden niedrige intrazelluläre Calcium Konzentrationen durch eine ATP abhängige Ca^{2+} Pumpe wiederhergestellt. Die Erhöhung intrazellulärer Calcium Konzentrationen löst die Ausschüttung von Vesikeln in den synaptischen Spalt aus. Die darin enthaltenen Neurotransmitter sind biochemisch betrachtet meist Derivate von Aminosäuren, alpha-Aminosäuren oder Oligopeptiden [1]. Durch Diffusion gelangen die Neurotransmitter an die Postsynapse, dort binden sie an spezifische Rezeptoren. Diese Bindung ermöglicht die Bildung einer für spezifische Ionen durchlässigen Pore.

Die häufigsten Transmitter, die an die postsynaptischen, Liganden gesteuerten Kanäle binden, sind Glutamat und GABA [1]. Im Falle einer inhibitorischen Synapse kommt es an der Postsynapse zu einer Hyperpolarisation, bei einer exzitatorischen zu einer Depolarisation.

7.2.1.1 Exzitatorische Synapsen

Exzitatorische Synapsen dienen der Reizweiterleitung im zentralen Nervensystem. Gelangt ein Aktionspotential über das Axon einer Nervenzelle zum terminalen Endkopf, kommt es durch eine Depolarisation zum Calcium Einstrom. Dieser bewirkt die Ausschüttung der

Transmitter gefüllten Vesikel. Auf diese Weise wird der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat in den synaptischen Spalt entleert und diffundiert zur Postsynapse.

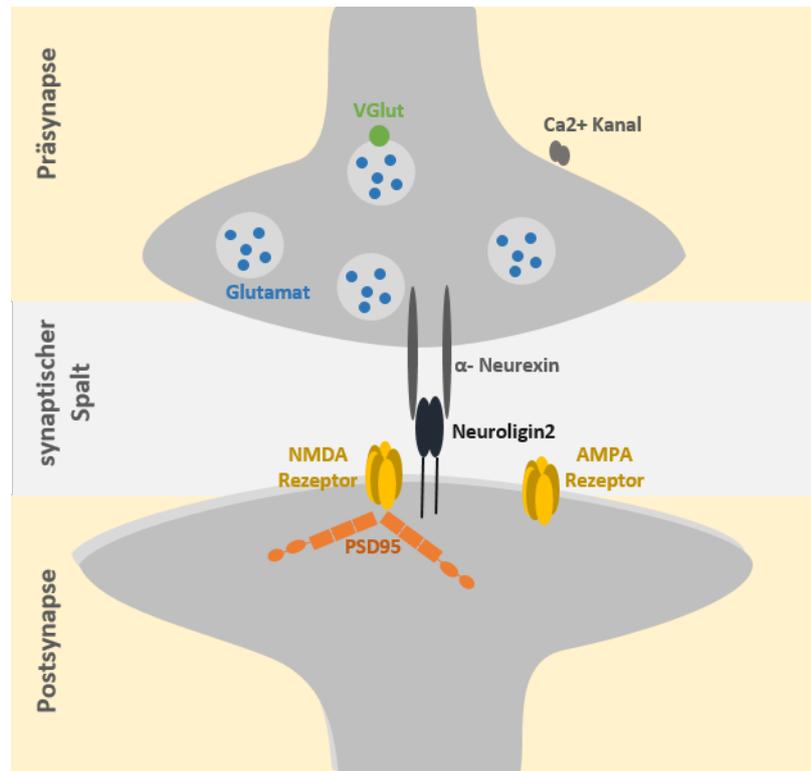


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer exzitatorischen Synapse

Die Synapse wird untergliedert in Präsynapse, synaptischen Spalt und Postsynapse. Trifft in der Präsynapse ein Aktionspotential ein, öffnen sich Calcium Kanäle und es kommt zum Einstrom von extrazellulärem Calcium. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung der mit Glutamat Neurotransmitter beladenen Vesikeln in den synaptischen Spalt. Die Präsynapse ist über alpha-Neurexin und Neuroligin 2 mit der Postsynapse verbunden. Diffundiert der Ligand Glutamat zu dem postsynaptischen NMDA oder AMPA Rezeptor und bindet an diesen, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche den Einstrom von Natriumionen ermöglicht.

Die Rezeptorklassen der Postsynapse werden in metabotrope und ionotrope Rezeptoren unterschieden. Metabotrope Rezeptoren ermöglichen eine Signalweiterleitung mit Hilfe eines Second Messengers oder eines anderen intrazellulären Transmitter-Systems. An der Postsynapse bindet Glutamat entweder an den ionotropen, trimeren NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -, den AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure) oder Kainatrezeptoren. Zur Stabilisierung der Rezeptoren bildet das postsynaptic density protein 95 (PSD95), welches zur Klasse der membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) gehört, ein multimeres Gerüst [20]. NMDA Rezeptoren vermitteln mit einigen hundert Millisekunden im Vergleich zu AMPA Rezeptoren mit wenigen Millisekunde eine relativ lange Depolarisation. Durch die Bindung des Liganden an die extrazelluläre

Bindungseinheit kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und einem Natriumioneneinstrom. Die Postsynapse wird depolarisiert, das Membranpotential der Zelle also verringert. Nach Beendigung der synaptischen Transmission werden die ausgeschütteten Neurotransmitter durch die Umwandlung in Glutamin recycelt und wieder in der Präsynapse aufgenommen. Innerhalb der Zelle kann nun wieder Glutamat entstehen und über den vesikulären Glutamat-Transporter (VGluT), angetrieben durch einen Protonengradienten, in die synaptischen Vesikel überführt werden [21]. Des Weiteren werden die überschüssigen Natriumionen aus der Postsynapse gepumpt um das ursprüngliche Membranpotential wiederherzustellen.

7.2.1.2 Inhibitorische Synapsen

Inhibitorische Synapsen sind essenziell für die Modulation von neuronal kodierten Informationen. Für die Umsetzung der Hemmung hat das Nervensystem verschiedenste Ebenen entwickelt. So gibt es einerseits eine Vielfalt an inhibitorischen Interneuronen, andererseits verschiedene Rezeptortypen, welche für die Umsetzung der Neurotransmission direkt an der Postsynapse lokalisiert sind. Zu den ionotropen Rezeptoren der inhibitorischen Synapse gehören GABA_A Rezeptoren und Glycin Rezeptoren. GABA_A Rezeptoren bestehen aus einem Heteropentamer unterschiedlichster Untereinheiten. Derzeit sind 19 verschiedenen Gene bekannt, die für 8 verschiedenen Subklassen an GABA Rezeptoruntereinheiten codieren [22]. Bindet der Neurotransmitter GABA extrazellulär an die

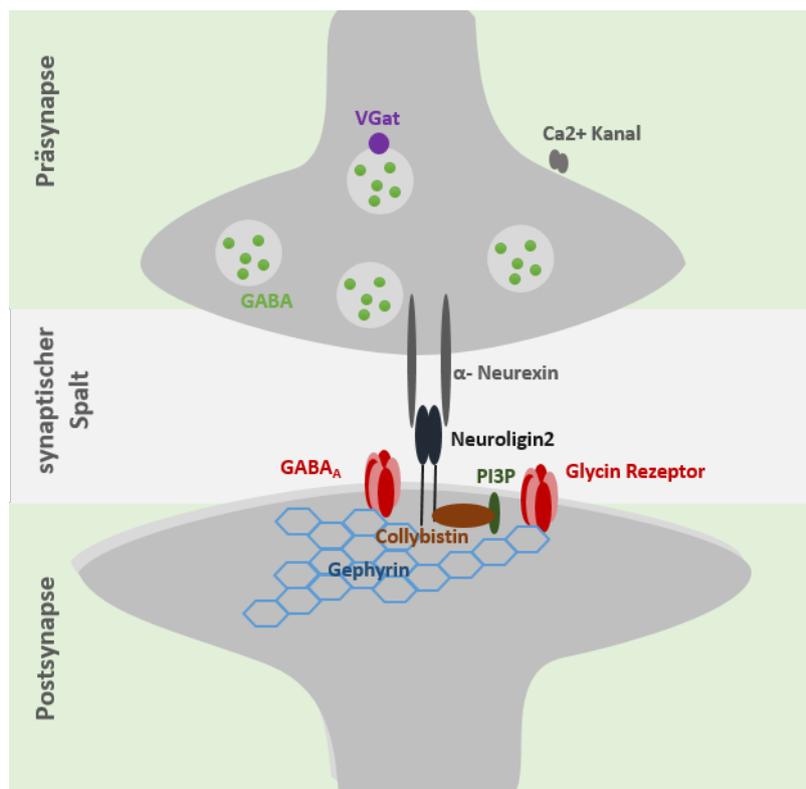


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer inhibitorischen Synapse

Trifft in der Präsynapse ein Aktionspotential ein, öffnen sich die Calcium Kanäle und es kommt zum Einstrom von extrazellulärem Calcium. Daraufhin kommt es zur Ausschüttung der mit Neurotransmitter beladenen Vesikel in den synaptischen Spalt. Die Präsynapse ist über alpha-Neurexin und Neurologin 2 mit der Postsynapse verbunden. Diffundiert der Ligand GABA zu dem postsynaptischen GABA_A Rezeptor und bindet an diesen, kommt es zu einer Konformationsänderung, dem Einstrom von Chloridionen und in der Folge zu einer Hyperpolarisation.

dafür vorgesehene Untereinheit, hat dies eine Konformationsänderung zur Folge. Die Pore des Ionenkanals wird geöffnet und Chloridionen können in die Postsynapse einströmen. Auf diese Weise wird das Membranpotential zu Gunsten einer Hyperpolarisation verändert. Nach Beendigung dieses Prozesses kommt es zur Wiederaufnahme des GABA Neurotransmitters in den Bereich der Präsynapse. Der vesikuläre GABA Transporter (VGAT) sorgt für die Neubeladung der präsynaptischen Vesikel mit GABA. Eine wichtige Komponente dieser Rezeptoren liegt intrazellulär verborgen. So hat sich herauskristallisiert, dass die Gerüstproteine der Rezeptoren immer mehr in den Fokus der Forschung rücken [23-25]. Gerüstproteine gelten als zentraler Vermittler zwischen dem Rezeptor an der Oberfläche und intrazellulären Signalwegen. An GABAergen Synapsen ist hauptsächlich das Gerüstprotein Gephyrin lokalisiert, σ -SCAM/MAGI2 ist sowohl an exzitatorischen als auch an inhibitorischen Synapsen zu finden [25-27]. Die Bedeutung von Gephyrin konnte in einem Gephyrin knock-out Experiment mit $Geph^{-/-}$ Mäusen bestätigt werden [28]. Fehlt den Mäusen das Gerüstprotein ist dies lethal für die Tiere. Grund dafür ist die fehlende Clusterung von GABA Rezeptoruntereinheiten an der Membranoberfläche.

7.2.1.2.1 Gephyrin

Gephyrin ist sowohl an GABAergen als auch an Glycinergen Synapsen zu finden. Ursprünglich wurde Gephyrin mit Glycin-Rezeptoren assoziiert, da 1982 eine Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden konnte [29].

Grundsätzlich besteht das Gerüstprotein Gephyrin aus drei unterschiedlichen Domänen, der G-, C- und E-Domäne. Während die G- und E-Domäne eine stabile dreidimensionale Struktur aufweisen, ist die C-Domäne sehr unstrukturiert und ermöglicht eine strukturelle Flexibilität des Proteins [30]. Über die E- und G-Domänen kommt es zur Multimerisierung von Gephyrin-Proteinen zu einem Gerüst [30, 31]. Die unterschiedlichen Domänen werden durch alternatives Splicing reguliert. Möglicherweise kann auf diese Weise die Signaling-Eigenschaft der Synapse reguliert werden [32, 33]. Die Lokalisation und der intrazelluläre Transport von Gephyrin ist abhängig von Mikrotubuli-assozierten Proteinen wie Motorprotein Kinesin (KIF5)[34], aber auch Dynein light chains 1 und 2 [35]. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Translokation von Gephyrin ist der GDP/GTP Exchangefaktor Collybistin (Cb) [36]. Die Interaktion von Gephyrin und Collybistin konnte über ein Yeast two-hybrid Screening identifiziert werden [37]. In Neuronen werden vier verschiedene Cb Isoformen exprimiert [38]. Collybistin bindet zuvor gebildete Gephyrin-Trimere und transportiert diese mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Mikrotubuli an die Membranoberfläche um dort Hexamer-Gerüststrukturen auszubilden [39]. Collybistin besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, der SH3 Domäne, der DH Domäne und der PH Domäne. Die SH3 Domäne blockiert die katalytische DH-Domäne sowie die Bindestelle der PH-Domäne. Sobald das Transmembranprotein Neuroligin 2(NL2) mit dem Collybistin-Gephyrin Komplex über die Sh3 Domäne interagiert, ändert sich die Konformation. Die Blockierung der PH-Domäne wird gelöst und Phosphatidylinositol-3-Phosphat, welches an der Membranoberfläche lokalisiert ist, kann gebunden werden. Das Gerüstprotein wird an die Membranoberfläche angekoppelt und weitere Gephyrin-Trimere können angelagert werden.

7.2.1.2.2 Glycin

Glycin ist zwar die kleinste und einfachste Aminosäure aber dennoch ein wichtiger inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Durch die Bindung an den postsynaptischen Glycin-Rezeptor kommt es zum Einstrom von Chloridionen. Seine Sonderstellung erhält Glycin dadurch, dass es neben seiner inhibierenden Wirkung auch als Agonist an die extrazelluläre Bindestelle des NMDA Rezeptors bindet [40].

7.2.1.3 Plastizität von Synapsen

1949 formulierte Donald Olding Hebb die Grundidee der neuronalen Plastizität und dem Konzept des Lernens.

„When an axon of cell A is near enough to excite cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.”[41]

Diese Hypothese konnte seitdem durch diverse Experimente bestätigt werden. Die Destabilisierung der synaptischen Homöostase hat weitreichende Folgen und ist Ausgangspunkt für Epilepsie, Angsterkrankung und neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen [31].

Die neuronale Plastizität ermöglicht es, Strukturen in Abhängigkeit ihrer Nutzung zu regulieren. Während die Neurogenese nach der Geburt in den meisten Gehirnarealen, bis auf den Bulbus olfactorius und den Gyrus Dentatus, aufhört und die Anzahl von Neuronen stetig zurückgeht, ist die Bildung von Synapsen äußerst dynamisch. Allerdings lässt diese Plastizität nach gewissen Perioden, in bestimmten Arealen auch nach. Beispielsweise fallen Kindern Lernprozesse deutlich einfacher als erwachsenen Menschen. Folglich ist es für die Funktionalität eines gesunden neuronalen Netzwerks wichtig, dass die Homöostase zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Signalen aufrechterhalten wird um in bestimmten Phasen des Lebens aufnahmefähiger für bestimmte Reize zu sein.

Es gibt zwei verschiedene Formen der Plastizität, die funktionelle und die strukturelle Plastizität. Die funktionelle Plastizität ist hauptsächlich intrinsischen Ursprunges und sorgt dafür, dass beispielsweise die Quantität des exozytierten Neurotransmitters beispielsweise erhöht wird. Eine weitere Veränderung, die eingeleitet werden kann, ist die lokale Erhöhung der postsynaptischen Rezeptordichte, damit mehr Liganden binden können und ein übermitteltes Signal somit stärker ausfällt [42]. Die strukturelle Plastizität wirkt sich globaler auf ganze neuronale Kompartimente aus. So können Rück- oder Ausbildungen ganzer Synapsen eingeleitet werden. Des Weiteren können sogar ganze Dendritenbäume oder Axone zurückgezogen oder neu ausgerichtet werden. Zur strukturellen Plastizität zählt auch die Neurogenese, also die Neubildung von Neuronen aus Vorläuferzellen.

7.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) spielen eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen. Ihre Aufgabe im menschlichen Körper ist es, unterschiedlichste intrazelluläre Prozesse zu regulieren, beispielsweise Wachstum, Differenzierung und metabolische Abläufe. RTKs werden aktiviert durch Rezeptor spezifische Liganden, die an die extrazelluläre Region binden und eine Liganden induzierte Homodimerisierung induzieren [43]. Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors vermittelt die physiologische Information des Liganden in das Innere der Zelle. Im Ruhezustand ist die intrazelluläre Domäne inaktiv, dazu werden in der Gruppe der RTK verschiedene Mechanismen verwendet um eine Inhibition sicherzustellen [44]. Eine Dimerisierung des Rezeptors löst diese Inhibition auf, es kommt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Initiierung einer intrazellulären Signaltransduktion.

7.3.1 REZEPTORTYROSINKINASEN ZUR REGULATION VON INTERNEURONKONNEKTIVITÄT

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere RTKs im Kontext der Regulation der Clusterung von Gephyrin beschrieben. Beispielsweise sind der Neurotrophinrezeptor TrkB [45] und der Ephrinrezeptor EphA7 [46] bereits ausführlich analysiert worden. Ephrinrezeptoren gehören zu der größten Klasse der Rezeptortyrosinkinasen und wirken nachweislich im Prozess der Langzeitpotenzierung [47]. Zur Klasse der Neurotrophinrezeptoren gehören unter anderem die TrK Rezeptoren A, B und C. Sie binden neurotrophe Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung und die synaptische Übertragung beeinflussen. Beide Rezeptortyrosinkinasen wurden auf Grundlage eines HeLa-Zell basierten siRNA Screenings identifiziert [45]. Zuvor mit Gephyrin und Neurofascin (das Zelladhäsionsmolekül bewirkt nachweislich eine gesteigerte Gephyrinclustergröße) cotransfizierte HeLa Zellen wurden mit verschiedenen siRNAs behandelt. Als Readout wurde die Gephyrinclustergröße ausgewertet. Ein weiterer potentieller Kandidat, der in diesem Screening aufgetaucht uns an der Gephyrinclusterung beteiligt zu sein scheint, ist die Rezeptortyrosinkinase cMet.

7.3.2 CMET

cMet Signaling ist involviert in die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen. Eine besonders große Bedeutung hat cMet in der Regulation der Gewebs-Homöostase. Kommt es zu einer veränderten cMet Expression, ist dies der Ausgangspunkt für verschiedenste Tumorerkrankungen. Während cMet in der Tumorforschung bereits viel Aufmerksamkeit genossen

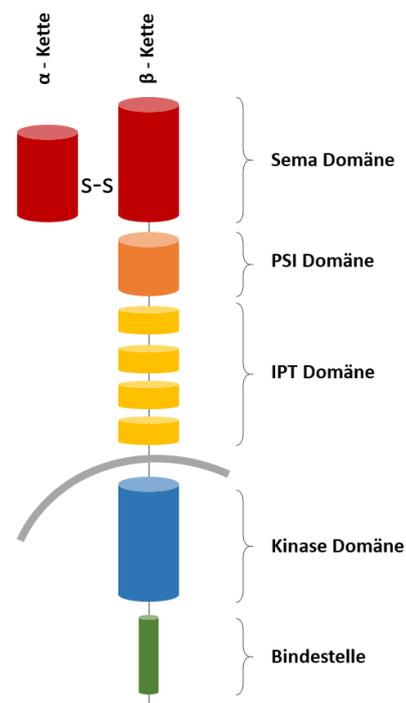


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Rezeptortyrosinkinase cMet

Der Rezeptor cMet besteht aus einem extra- und einen intrazellulären Anteil. Während der extrazelluläre Teil aus der Sem-, PSI- und IPT-Domäne besteht, umfasst der intrazelluläre Bereich eine Kinase-Domäne und eine multifunktionelle Bindestelle [1].

hat, ist die Rolle von cMet im zentralen Nervensystem bislang wenig untersucht worden. Die Rezeptortyrosinkinase besteht aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne (Abbildung 4), wobei der extrazelluläre Anteil aus drei Subdomänen besteht. N-Terminal liegt die Sema-Domäne, welche zur Bildung eines Semaphorins notwendig ist. Das Semaphorin dient der Wachstumswegfindung von Neuronen. Angelagert an die Sema-Domäne liegt die Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-Domäne und die Immunglobulin-Plexin-Transkriptions- (IPT)-Domäne. Intrazellulär liegt die katalytische Tyrosinkinasedomäne. C-Terminal liegt eine multifunktionelle Bindestelle vor, welche bei der Aktivierung der Kinase durch den Liganden HGF (Hepatozyten Wachstumsfaktor) weitere GTPasen und Adapterproteine rekrutiert.

Im zentralen Nervensystem beeinflusst HGF das Wachstum von Dendriten und induziert gerichtetes Axonwachstum. Bindet HGF an seinen Rezeptor, kommt es zu einer Homodimerisierung und der Phosphorylierung zweier Tyrosinreste (Y1234 und Y1235) an der Kinase Domäne des Rezeptors [48]. Ähnlich einer Kettenreaktion werden die Tyrosinreste der angegliederten Bindestelle phosphoryliert (Y1349 und Y1356), was wiederum zu einer Konformationsänderung führt, die letztendlich eine Rekrutierung von Adapterproteinen einleitet [49]. Das Resultat ist die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) / Akt- oder des MAPK/ERK-Signalwegs [50].

An exzitatorischen Synapsen wurde cMet als Regulator von synaptischen Proteinen beschrieben [51]. Walikonis und Lim zeigten, dass die Expression von cMet und dessen Ligand HGF mit der Genese des Hippocampus korreliert [52]. An DIV1 konnte nur eine geringe Menge HGF in hippocampalen Ratten-Neuronen festgestellt werden, während an DIV8 bereits eine 5-fache Konzentration detektiert wurde. Die Expression von cMet blieb von DIV1 an deutlich messbar und konstant. Kommt es zu einer Störung der hippocampalen Entwicklung, kann dies eine Fehlregulation von cMet begünstigen und das Risiko für Autismus erhöhen. Da die sensorische Wahrnehmung autistischer Kinder meist beeinträchtigt ist, versuchte Powell den Mechanismus der deregulierten somatosensorischen Inhibition näher zu ergründen. In einem transgenen Met-EMX1 (Cre-Lox-P) Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Met-defizienten Tieren eine Reduktion der postsynaptischen Inhibition in thalamocorticalen Arealen aufwies [53]. Diese Veränderung ist vermutlich in einer geringen GABA_A Rezeptordichte begründet [1].

7.4 Der mTOR Signalweg

Den Anfang seiner bedeuteten Geschichte nimmt das mechanistic target of Rapamycin (mTOR) Protein auf einer Expedition im Jahre 1964 zu den Osterinseln. Auf dieser Forschungsreise wurden diverse Bodenproben entnommen, um diese hinsichtlich antimikrobieller Agenzien ausführlich zu analysieren [54]. Dass aus diesen Proben eine wichtige Substanz isoliert werden wird, die in der nachfolgenden Forschung noch von großer Relevanz sein wird, war zu diesem Zeitpunkt noch niemandem bewusst. Bei dem Fund handelte es sich um Rapamycin, welches immunsuppressive und Tumor abtötende Eigenschaften aufwies. Erstmals wurde Rapamycin im Komplex mit der Peptidyl-Prolyl-Isomerase FKBP12 beschrieben. Erst drei Jahrzehnte später wurde über biochemische Studien gezeigt, dass mTOR von Rapamycin über die FKBP12 Domäne inhibiert wird [55]. mTOR ist eine hochkonservierte

Serin/Threonin Proteinkinase, welche ein zentraler Regulator des zellulären Metabolismus ist. Durch seine Phosphorylierungsaktivität steuert mTOR die Translation verschiedenster Transkriptionsfaktoren.

Grundsätzlich besteht mTOR aus zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Untereinheiten, dem TOR Komplex 1 (mTORC1) und TOR Komplex 2 (mTORC2). Während der mTORC2 Komplex aus den mTOR, Rictor, SIN1 und mLST8 Untereinheiten besteht und an der Regulation der Fettsäuresynthese beteiligt ist, übernimmt mTORC1 andere Aufgaben. mTORC1 umfasst ebenfalls mehrere Komponenten, mTOR, Raptor, PRAS40 und mLST8. Der Komplex ist beteiligt an der Translation, am Zellwachstum und an der Nukleotidbiosynthese. Ist mTOR aktiviert, induziert dies die Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins mittels der p70-S6 Kinase beta-1 (S6K). Durch diese Aktivierung wird die Proteinsynthese an den Ribosomen eingeleitet. Kommt es zur Stimulation der Rezeptortyrosinkinase durch Wachstumsfaktoren oder spezifische Liganden, wird eine downstream Kaskade über ein Ras GTPase gekoppeltes Protein in Gang gesetzt. Neben dem MAP (mitogen-activated protein) Kinase-Signalweg, wird auch die PI3/Akt Kaskade induziert. Beide Signalwege inhibieren den mTOR Negativregulator TSC2. Zusammen bilden die beiden Proteine TSC1 und TSC2 mit TBC1D7 einen oligomeren Tumor-Suppressor-Komplex. Die Aufgabe dieses Komplexes ist die Wachstumsfaktor-vermittelte Regulation der S6 Kinase, und des EIF4EBP1 Transkriptionsfaktors. Dies ist möglich durch die inhibierende Wirkung von TSC2 auf Rheb. Rheb ist in erhöhtem Maß im Hippocampus und Cortex exprimiert [56] und involviert in neuronales Wachstum, Differenzierung und axonale Regeneration. Liegt Rheb in seiner aktiven, GTP gebundenen Form vor, führt dies wiederum zu einer mTORC1 Aktivierung. Vor allem die Lokalisation des Komplexes spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des mTOR Signalwegs. Rheb lokalisiert über seine C-terminale Farnesylierung am Lysosom [57]. In Abwesenheit von Insulin oder Wachstumsfaktoren ist der TSC2 Komplex ebenfalls am Lysosom lokalisiert. Durch eine Stimulation hingegen kommt es zu einer Loslösung des Komplexes und einer Aktivierung von mTOR [58]. Das lysosomale Rekrutieren von TSC2 geht also einher mit der Inaktivierung von mTOR [59]. Eine weitere wichtige Aufgabe hat mTOR in der Regulation der Translokation von Gephyrin [60].

7.4.1.1 Wie beeinflusst mTOR die Gephyrin Translokation und welche Rolle spielt der Negativregulator TSC2?

In inaktivem Zustand ist mTOR mit Gephyrin assoziiert [46]. Aus Neuronen des Rückenmarks ist bekannt, dass mTOR über die Aminosäuren an den Stellen 944-1338 mit Gephyrin interagiert [55]. Neben den bereits beschriebenen Aufgaben beeinflusst mTOR die Translokation von Gephyrin an die Zellmembran. Während mTORC1 am lysosomalen Kompartiment phosphoryliert wird, wird eine Dissoziation von mTOR und Gephyrin eingeleitet. Neben den Phosphorylierungen ist die Interaktion mit mTOR ein weiterer Regulationsmechanismus, der zur Bildung des stabilisierenden Gephyringerüsts beiträgt. Während die BDNF- (Brain-derived neurotrophic factor) Stimulation hippocampaler Zellen die Dissoziation von mTOR und Gephyrin verstärkt, bewirkt eine Rapamycin Behandlung einen gegenteiligen Effekt, nämlich eine verminderte Clusterung an der Membranoberfläche [45, 61]. Über die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), ERK und Akt wird das Gerüstprotein Gephyrin an den Stellen

Ser268 und Ser270 ebenfalls phosphoryliert [62]. Durch die Modulation von ERK kann die Gephyrinclusterung beeinflusst werden [63].

7.5 Die endosomalen Kompartimente

7.5.1 STRUKTUR UND FUNKTIONEN DER ENDOSOMALEN KOMPARTIMENTE

Prinzipiell stellen Endosome räumlich abgetrennte Kompartimente im Cytosol einer Zelle dar. Sie zeichnen sich durch einen sauren pH-Wert aus, der durch ATP (Adenosintriphosphat)-getriebene Protonenpumpen generiert und aufrechterhalten wird. Die kleinen Kompartimente sind wichtig für zellphysiologische Abläufe, Rezeptor-Recycling und Zelltod. Das veränderte Milieu innerhalb des frühen Endosoms begünstigt beispielsweise die Dissoziation von Rezeptoren und Liganden. Auf diese Weise werden endozytierte Rezeptoren recycelt und für eine neue Bindung an die Oberfläche transloziert, während die Liganden über weitere endosomale Stationen degradiert werden [64]. Die Endozytose markiert dabei den Startpunkt des komplexen endosomalen Netzwerks, welches Recycling- und Degradierungs-Prozesse innerhalb der Zelle steuert. Als zweite Station führt das frühe Endosom eine Sortierung durch. Über das späte Endosom werden Liganden an das Lysosom, das endgültige Degradierungs-Kompartiment weitergeleitet. Eine Klasse an Proteinen, die hauptsächlich an der Konversion und Regulation des endosomalen Signalwegs beteiligt ist, sind die Ras-assoziierten Binde-Proteine (Rab). Hierbei handelt es sich um G-Proteine, die ihren Aktivierungszustand durch die Bindung von GTP zu GDP ändern können. Im aktivierten Zustand lokalisieren Rabs mit intrazellulären Membranen und initialisieren die Rekrutierung von Rab-Effektor-Proteinen [65]. Charakteristisch für das frühe Endosom sind die Rab-Proteine 5, 4, 10, 14, 21 und 22 [66].

Rab5A gilt dabei als einer der am meisten erforschten Marker des frühen Endosoms und als Master-Regulator der Endosom-Konversion. Rab5A wird aktiviert mit Hilfe des Guanin Nukleotid Exchange Factors (GEFs) Rabex-5, der mit Hilfe von Rabapentin-5 das Rab5A gebundene GDP zu GTP werden lässt [67]. Ein weiterer Effektor von Rab5A ist der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI(3)K) Komplex, der für die Herstellung von PI(3)P notwendig ist. Diese Verbindung wiederum sorgt dafür, dass weitere Effektor-Proteine rekrutiert und die endosomalen Transportwege aufrechterhalten werden.

Die Reifung des frühen Endosoms führt zum späten Endosom, für welches Rab7 und Rab9, sowie ein pH-Wert von 6.0-4.9 charakteristisch sind. Die Konversion von Rab5A zu Rab7 wird mit Hilfe weiterer GEFs (SAND-1/Mon1 und Ccz1) vollzogen [68]. Der Übergang zwischen dem späten Endosom und dem Lysosom ist sehr dynamisch und als fließend zu bezeichnen. So lassen sich an lysosomalen Kompartimenten vornehmlich Lysosom assoziierte Membran-Proteine (LAMPs) finden, allerdings auch das Protein Rab7.

8 ZIELSETZUNG

Ziel der Doktorarbeit war es die Rezeptortyrosinkinase cMet im Kontext der Interaktion zwischen mTOR und Gephyrin besser zu beschreiben und mögliche Auswirkungen auf die Stabilität inhibitorischer sowie exzitatorische Synapsen im Gyrus Dentatus zu untersuchen. Des Weiteren sollte in hippocampalen Kulturen untersucht werden, ob cMet im *in vitro* System induziert werden kann und das Clusterverhalten von Gephyrin beeinflusst. Weiterführende Analysen sollten Aufschluss darüber geben inwiefern die cMet Signalkaskade das mammalian Target of Rapamycin aktiviert und somit an der Regulation der Gephyrinclusterung beteiligt ist. Um den intrazellulären Signalweg weiter zu beschreiben wurde die Expression des mTOR Negativregulator TSC2 *in vivo* und *in vitro* inhibiert, um mögliche Effekte auf die synaptische Verschaltung zu identifizieren. Durch die Manipulation der endosomalen Konversionen sollte in den Translokationsprozess von Gephyrin eingegriffen werden.

Durch diese Arbeit sollten drei unterschiedliche Blickwinkel auf die Regulation synaptischer und vor allem inhibitorischer Marker gelegt werden, die zur Stabilisierung GABAerger Synapsen notwendig sind, und im Zusammenhang mit Autismus Spektrum Erkrankungen stehen.

9 MATERIAL UND METHODEN

9.1 Materialien

Tabelle 2: Labormaterialien

	Hersteller	Katalognummer
2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs	N3200S
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH & Co. KG	2266.3
Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH & Co. KG	T846.3
Histoacryl-Gewebe	B Braun™	10316102
BMB	Roche	11112589001
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG	3737.3
Corning, Filter	Corning GmbH	431220
Corning® 100 mm Petrischalen	Corning GmbH	430167
Corning® 15 mL, 50 mL Zentrifugenröhrchen	Corning GmbH	430791
Corning® 75 cm², 175cm² TFlaschen	Corning GmbH	431464U
Costar+B16:D66® 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL Stripette®	Corning GmbH	4051,4101, 4251, 4501
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG	A994.1
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG	8040.3
FBS Fetal Bovine Serum	Life Technologies GmbH	10270-106
Fluorescence Mounting Medium	Agilent	S302380-2
Gibco™ B-27™ Plus Supplement (50X)	Gibco™	A3582801
HGF	Sigma-Aldrich	H1404
Histoacryl-Gewebe	B Braun™	10316102
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich	861405
Pferde Serum	Gibco™	16050130
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG	6669.3
L-Glutamin (200 mM), 100 mL	Life Technologies GmbH	25030024
Lipofectamine®2000 Reagent 1,5mL (1 mg/mL)	Life Technologies GmbH	11668-019
MEM (10x)	Gibco™	11430030
MEM + Earles Salt	gibco, by life technologies	11575032
Myviro clear Plate 96-well	greiner bio-one	655090
NEAA MEM (100x)	Life Technologies GmbH	11140-035
One Shot® TOP10 Chemically competent Cells	Life Technologies GmbH	C404003
One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli	Life Technologies GmbH	C737303
Opti-MEM® I (1x) + GlutaMAX™	Gibco™	51985-026
Parafilm	Carl Roth GmbH & Co. KG	H951.1
PBS	Gibco™	10010056
PHA-665752	Sigma-Aldrich	P3391-16
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000µl)	TipOne® STARLAB GmbH	S1163-1700, S1161-3700, S1161-1720
Protease Inhibitor complete EDTA-free	Roche	11873580001
Rapamycin	Sigma Aldrich	553210
Rotiphorese	Carl Roth GmbH & Co. KG	3029.1
Screenstarplatten	greiner bio-one	655098

Spectinomycin	Sigma-Aldrich	S1317-56
Trypsin-EDTA (0,05 %), phenol red	Life Technologies GmbH	25300054

Tabelle 3: Chemikalien und Antibiotika

	Hersteller	Katalognummer
Ampicillin Natriumsalz, 100mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	K029.2
Borat	Sigma Aldrich	B9876
Borax	Sigma Aldrich	B0252
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	3738.4
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG	T171.3
Ethidium bromide solution, 10 mg/mL	Sigma Aldrich	E1510
G418	Gibco™	10131027
Glucose	Gibco™	
Glycin	SERVA Feinbiochemie	23390
Hygromycin	Carl Roth GmbH & Co. KG	CP12.2
Kanamycin 25 mg/mL	Carl Roth GmbH & Co. KG	T832.2
NaF	Carl Roth GmbH & Co. KG	P756.1
NaHCO3	Merck	1.06329
Natriumazid	Sigma Aldrich	S8032-100G
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	9265.1
Natriumcitrat		
Sodium Pyruvat	Gibco™	
Spectinomycin	Sigma Aldrich	S1317-56
Tris	Sigma Aldrich	AE15.3
Tris-HCL	Sigma Aldrich	9090.3
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG	3051.3
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG	9127.1

Tabelle 4: Puffer und Medien

	Ingredienzen	pH	behandelt
Boratpuffer	50 mM H3BO3 12 mM Na2B4O7	8,5	sterilfiltriert
20 % (w/v) Glukose			sterilfiltriert
HBSS-Hepes-Puffer	HBSS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , ohne Phenolrot 0,7 % (v/v) 1 M Hepes 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin (100 x)		sterilfiltriert
Natriumcitrat-Puffer	250 mM Tri-Natriumcitrat	8,5	sterilfiltriert
PEI-Beschichtungs-Lösung	0,05 % (v/v) 5 % PEI in Boratpuffer		sterilfiltriert
PFA 4%	40g PFA, 2x NaOH Pellets	7,4	
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA	7,8	
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA	8	

NMEM-B27-Medium	MEM (10 x) 4 % (v/v) 5,5 % NaHCO ₃ 3 % (v/v) 20 % Glucose 2 % (v/v) B27-Supplement 1 % (v/v) Sodium Pyruvate Solution 1 % (v/v) 200 mM Stable Glutamin (200 mM)	sterilfiltriert
HEK293FT-Medium (ohne Serum)	OptiMEM	
HEK293FT-Medium	DMEM high Glucose 10 % (v/v) FKS Hyclone 6 mM L-Glutamin 1 % (v/v) NEAA (100 x) 500 µg/ml G-418 Sulphate Solution	

Tabelle 4: Medikamente

Produkt	Hersteller	eingesetzte Konzentration
Meloxicam		1-2mg/kg
Metamizol		50mg/kg
Ketamin	WDT	100mg/kg
Xylavet	CP-Pharma GmbH	10mg/kg
Lidocain		2% nach Bedarf
Temgesic		0,1 mg/kg
Isofluran		1,5-5%

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung	Wirtsspezies	Arbeitskonzentration	Hersteller	Katalognr.
anti-c-MET	Kaninchen	1:400 (Immuncyto.)	Abcam	ab51067
anti-GAD65/ GAD2	Maus	1:500 (Immunhisto.)	Synaptic Systems GmbH	198-111
anti-Gephyrin	Maus	1:100 (Immuncyto.)	Synaptic Systems GmbH	147021
anti-MAP2	Hühnchen	1:5000	ThermoFisher	PA1-10005
anti-phospho-c-Met (Tyr1230,Tyr1234,Tyr1235)	Kaninchen	1:500	invitrogen	# 44-999G
anti-PSD95	Kaninchen	1:300 (Immunhisto.)	Abcam	ab18258
anti-PSD95	Maus	1:250 (Immuncyto.)	Synaptic Systems GmbH	124011
anti-RAB7	Maus	1:900 (Immuncyto.)	Sigma-Aldrich	R8779
anti-VGAT	Kaninchen	1: 500	Synaptic Systems GmbH	131003
anti-VGluT 1	Maus	1:300 (Immunhisto.)	Synaptic Systems GmbH	135-511
HA Tag (6E2)	Maus	1:100 (Immuncyto.)	Cell Signaling	#2367
p70 S6 Kinase (49D7)	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	# 2708S
Phospho-p70S6Kinase	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	#9205
Tuberin/TSC2 (D93F12)	Kaninchen	1:800	Cellsignaling	#4308

Tabelle 6: Maschinen

	Hersteller
Agarose-Gelkammer	biostep GmbH
Autoklav 2540 ELV	Systec GmbH
Bakterien-Schüttler	New Brunswick Scientific GmbH
Brutschrank	BINDER GmbH
Cell Observer SD	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Heraeus® HERAsafe Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc.
Heraeus® Klevitron®T Bakterienbrutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.
Intas Imager UV System	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Inverses Mikroskop Nikon TMS-F	Nikon GmbH
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG
Milli-Q® Advantage	Merck Chemicals GmbH
NanoDrop™ 2000/2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG
NucleoCounter® NC-200™	chemometec
Phoenix RS TRO5	Phoenix Instrument
Pipette (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG
Schwenker Duomax 2030	Heidolph Reax top
Spannungsanlage für Gelelektrophorese	Major Science
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultrazentrifuge WX Ultra Series	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortexer	Heidolph Reax top
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG
Zentrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG

Tabelle 7: Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System	Invitrogen	K4937-00
BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen	K4935-00
Cells-to-CT™ 1-Step TaqMan™ Kit	Invitrogen	A25603
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen GmbH	12945

9.1.1.1 Tiere

Sowohl für die Präparation primärer Neurone als auch für die stereotaktischen Injektion der lentiviralen Suspensionen wurden Sprague Dawley (SD) Ratten von Janvier bezogen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen mit zwölf Stunden Tag/Nacht-Zyklus, Wasser und Futterpellets ad libitum gehalten. Für beide experimentellen Prozeduren lag eine Tierversuchsgenehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen vor (Kennziffer des Tierversuchsantrags: NMI118).

Tabelle 8: Primer

Oligo	Sequence
cMet_3923_top	TGCTGCATACAAGGCGTCTGGACAGTGTTTTGGCCACTGACTGACACTGTCCACGCCTTGTATG
cMet_3923_bottom	CCTGCATACAAGGCGTGGACAGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACTGTCCAGACGCCTTGTATGC
cMet UTR_top	TGCTGTGTTTCTTGAAGTGGGCTGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCAGCCCATCCAAGAAACA
miCTR_top	GAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATT
miTSC2_500_top	TGCTGAGGACAAGCCAACATCCATCCGTTTTGGCCACTGACTGACGGATGGATTGGCTTGCCTC
miTSC2_500_bottom	CCTGAGGACAAGCCAATCCATCCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGGATGGATGTTGGCTTGCCTC
miTSC2_2675_top	TGCTGTAATGAACCACATGGCTATGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCATAGCCGTGGTTCATTA
miTSC2_2675_bottom	CCTGTAATGAACCACGGCTATGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCATAGCCATGTGGTTCATTAC

9.1.1.2

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller	Ursprungslabor
mCherry-Rab5CA(Q79L)	#35138	Addgene	Sergio Grinstein
mCherry-Rab5DN(S34N)	#35139	Addgene	Sergio Grinstein
mRFP-Rab5	#14437	Addgene	Ari Helenius
GFP-rab7 WT	#12605	Addgene	Richard Pagano
GFP-rab7 DN	#12660	Addgene	Richard Pagano
EGFP-Rab7A Q67L	#28049	Addgene	Richard Pagano
EGFP-Rab4A	#49434	Addgene	Marci Scidmore
EGFP-Rab4AQ67L	#49475	Addgene	Marci Scidmore
EGFP-Rab4AS22N	#49476	Addgene	Marci Scidmore
HA-Rab11-DN (S25N)	#101046	Addgene	Ken-Ichi Takemaru
HA-Rab11-WT	#101047	Addgene	Ken-Ichi Takemaru
EGFP-Rab11AQ70L	#49553	Addgene	Marci Scidmore
HA-Rab8a-WT	#101048	Addgene	Ken-Ichi Takemaru
HA-Rab8a-DN (T22N)	#101049	Addgene	Ken-Ichi Takemaru
HA-Rab8a-CA (Q67L)	#101050	Addgene	Ken-Ichi Takemaru
pLenti04/CAMKII/mi3923/SEW		Pauline Jeckel	
pLenti04/CAMKII/miUTR/SEW		Pauline Jeckel	
pLenti04/CAMKII/mi500/SEW		Martin Kriebel	
pLenti04/CAMKII/mi2675/SEW		Martin Kriebel	
pLenti04/CAMKII/miCTR/SEW		Martin Kriebel	
pRFP-N1		Hansjürgen Volkmer	
pEGFP-N1		Hansjürgen Volkmer	

Plasmidkarte pLenti04/CAMKII/mi___/SEW siehe Anhang.

9.2 Molekularbiologische Methoden

9.2.1 TRANSFORMATION

Zum Amplifizieren von Plasmiden und zur Aufrechterhaltung der Plasmid-Stocks wurden ca. 1ng des entsprechenden Plasmids in ein Vial kompetenter Zellen (Top10) gegeben und auf Eis für 30min inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 30sec bei 42°C durchgeführt. Nachdem die Zellen für weitere 2min auf Eis inkubiert wurden, wurde 250µl SOC Medium zu den kompetenten Zellen hinzugegeben und für 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100µl des Ansatzes wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum neben dem Bunsenbrenner ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Brutschrank inkubiert. Nach 24h wurden Kolonien gepickt und über eine LB-Flüssigkeits-Kultur (ebenfalls mit Selektionsantibiotikum versetzt) expandiert. Die Aufreinigung der Plasmid DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

9.2.2 MESSUNG DER DNA-KONZENTRATION

Die Konzentration doppelsträngiger DNA wurde mit Hilfe eines Nanodrops bestimmt. Dazu wurde zuerst das Medium, in dem die DNA gelöst wurde als Standard festgelegt und dann der Probengehalt in µg/µl gemessen. Über den Quotienten der 260/280nm und 260/230nm konnte die Reinheit der Präparation bestimmt werden.

9.2.3 RESTRIKTIONSVERDAU

Für einen Restriktionsverdau wurden min. 100ng DNA, 0,5µl Restriktionsenzym, 1µl Reaktionspuffer auf 10µl mit ddH₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für min. 1h bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

9.2.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Es wurden 1%ige Agarosegele verwendet (angesetzt in 1x TEA Puffer, auf 120ml Ansatz 10µl Ethidiumbromid). Die DNA Suspensionen, welche aufgetragen wurden, wurden zuvor mit einem 6x Ladepuffer versetzt. An die mit TAE Puffer gefüllten Gelkammern wurde eine Spannung von 120V für 60min angelegt. Als Marker wurde eine 1kb Ladder verwendet. Mit einem Imager wurde das Ergebnis visualisiert.

9.3 Zellkultur

9.3.1 BESCHICHTUNG VON ZELLKULTURPLATTEN

Vor der Aussaat der präparierten Neurone wurden die Zellkulturplatten mit einer Pei-Beschichtung behandelt. Hierzu wurde eine Beschichtungslösung angesetzt aus 50% Borax, 50% Borat und 0,001% Pei. Je nach Zellkulturformat wurden die Kavitäten mit 100µl (96-well-Platte) oder 2ml (6-well-Platte) der Beschichtungslösung befüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Direkt vor der Aussaat der primären Neurone wurden die Platten 3x mit destilliertem Wasser gewaschen und darauf folgend mit 100µl pro Kavität NMEM-B27-Medium (+5% Pferde-Serum) vorbereitet.

9.3.2 PRÄPARATION PRIMÄRER NEURONE

Für die Präparation primärer Neurone wurde eine weibliche, trüchtige Sprague-Dawley Ratte (Janvier Labs) verwendet, die nach den entsprechenden Richtlinien der Tierschutz-Versuchstierverordnung gehalten wurden. Die Embryonen wurden am Embryonaltag 17 entnommen. Das Muttertier wurde mit CO₂ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Nachdem der Uterus eröffnet wurde, wurden die Embryonen entnommen und ebenfalls dekapitiert. Die Gehirne der Embryonen wurden entnommen und in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) überführt. Unter einem Binokular wurde das Kleinhirn entfernt und das Großhirn zwischen den beiden Hemisphären getrennt. Die Dura mater wurde mit Hilfe zweier Pinzetten entfernt und anschließend der Hippocampus, sowie Cortex freigelegt, abgetrennt und in Eis gelagertem HBSS aufbewahrt. Im Anschluss an die Präparation wurde das präparierte Gewebe 10 min bei 37°C trypsiniert. Nachfolgend wurde das Trypsin vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, die Cortices/ Hippocampi in 2ml NMEM-B27 (+5% Pferde-Serum) aufgenommen und etwa 10-15mal durch die 1000µl Pipette trituriert, um die Gewebstücke zu vereinzeln. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonsieb (48µm) gefiltert. Während die corticalen Zellen auf ein Volumen von 30ml mit NMEM-B27-Medium aufgefüllt wurden, wurden die hippocampalen Zellen auf 10ml aufgefüllt. Anschließend wurde mit Hilfe des Nucleocounters die Zellzahl sowie Vitalität bestimmt und ein entsprechendes Volumen für die Aussaat errechnet (96-well-Platte: $3,5 \times 10^4$ /well; 6-well-Platte: $1,2 \times 10^6$ /well). 4h nach der Präparation wurde das Pferde-Serum haltige Medium abgenommen und durch frisches NMEM-B27-Medium ersetzt. Die weiteren Medienwechsel wurden im Rhythmus Montag-Mittwoch-Freitag fortgeführt. Zur weiteren Kultivierung wurden die primären Neurone in NMEM-B27-Medium gehalten.

9.3.3 TRANSFEKTION

Neuronale Zellen wurden an DIV7-8 der Kultivierung transfiziert. Vorerst wurde das Medium der zu transfizierenden Kavitäten direkt vor der Transfektion auf 50µl reduziert. Für eine Transfektion im 96-

well Format wurden 0,3µg DNA sowie 1µl Lipofectamin pro Kavität eingesetzt. Zwei verschiedene Ansätze wurden im Vorfeld vorbereitet (die Angaben entsprechen dem Ansatz für eine Kavität). In den DNA-Ansatz-A wurde 25µl Medium und die entsprechende Menge an Plasmid-DNA gegeben (bei einem Transfektionsansatz mit mehr als einem Plasmid wurden die Mengen der Plasmide in Abhängigkeit ihrer Größe auf 0,3µg berechnet), während im Lipofektamin-Ansatz-B 25µl Medium mit 1µl Lipofektamin gemischt wurden. Die Ansätze A und B wurden für 5min einzeln inkubiert, anschließend zusammengegeben und für weitere 20min inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz (50µl) auf die primären Zellen gegeben. Nach 4h wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Die Neurone wurden für weitere 1-3 Tage kultiviert und anschließend fixiert.

9.3.4 LENTIVIRALE PRODUKTION

Für die Herstellung von Viren wurden T175 Flaschen mit HEK-FT Zellen bei 8% CO₂ in Serum freien Medium kultiviert. An Tag 1 wurde ein kompletter Mediumwechsel mit den Zellen (optimale Konfluenz von 80%) auf OptiMEM durchgeführt. An Tag 2 wurden die entsprechenden Transfektionsansätze angesetzt. Pro T175 wurden für den DNA-Ansatz-A 27µg Packaging Mix (bestehend aus Plasmiden, die für die Bildung des Viruskapsids notwendig sind: pLP1/pLP2/pLP_VSVG (1 µg/µl); Verhältnis 1:1:1 mol (≡ 47,1 µl pLP1; 22,1 µl pLP2; 30,8 µl pLP_VSVG)), 4,5ml OptiMEM und 18µg des lentiviralen Plasmids gemischt und 5min inkubiert. In dem Lipofektamin-Ansatz-B wurden 144µl Lipofektamin2000 und 4,5ml OptiMEM gemischt und ebenfalls für 5min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die beiden Ansätze A und B zusammengeführt und für weitere 20min inkubiert.

Während der Inkubation der beiden Ansätze wurden die HEK-FT Zellen trypsinisiert (7ml Trypsin pro Flasche) und herunterzentrifugiert. Das Pellett wurde in 2ml OptiMEM aufgenommen und für die Zellaussaatdichte von $3,8 \times 10^7$ pro T175 gegebenenfalls vorverdünnt.

Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurden 15ml OptiMem Medium in der jeweiligen T175 Flasche vorgelegt und dann der 9ml Transfektionsansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden von nun an bei 5% CO₂ bei 37°C inkubiert.

An Tag 3 der Virusproduktion wurde ein kompletter Mediumwechsel unter S2-Bedingungen vollzogen und vorsichtig 30ml frisches OptiMEM Medium auf die Zellen gegeben ohne den Zellrasen abzulösen. Das verbrauchte Medium wurde verworfen.

An Tag 4 (48h nach Transfektion) und 5 (72h nach Transfektion) wurde der Zellkulturüberstand sterilfiltriert, in 50ml Falcons überführt und bei 4°C (Kurzzeitlagerung) oder -80°C (Langzeitlagerung) aufbewahrt. Nach Abnahme des geernteten Mediums wurde 30ml frisches OptiMem abermals vorsichtig auf die Zellen gegeben.

Danach wurden die viralen Überstände in Ultrazentrifugenröhrchen überführt (28ml pro Röhrchen). Die viralen Partikel wurden durch Ultrazentrifugation bei 4°C und 50.000g (Rotor AH-629, Sorvall) für 90min pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die viralen Pellets in 50µl 1% BSA/PBS je Zentrifugenröhrchen bei 4°C über Nacht gelöst. Falls Doppelansätze angefertigt wurden, wurden diese am folgenden Tag gepoolt, danach aliquotiert und bei -80°C gelagert.

9.3.5 TITERBESTIMMUNG

Die Titer-Bestimmung der lentiviralen Konstrukte wurde mit Hilfe des Lenti-X p24 Rapid Titer Kits bestimmt. Die Durchführung wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers befolgt. Die lentiviralen Suspensionen wurden 1×10^{-5} und 1×10^{-6} vorverdünnt und die Konzentrationen anhand der p24-Standarddeichkurve berechnet. Für die *in vivo* Versuche wurden Konzentrationen von 5ng/µl beziehungsweise 5×10^7 Partikel pro µl eingesetzt. Für die *in vitro* Experimente wurde mit 1×10^6 Partikel pro µl infiziert.

9.3.6 TRANSDUKTION

Für die Transduktion der primären Neurone mit dem hergestellten Virus wurden präparierte Neurone an DIV3 (3 days *in vitro*) in einem Kulturvolumen von 100µl transduziert. Dazu wurden bereits vorkonzentrierte Viren auf die Zellen gegeben. Die Viren wurden für max. 2 Tage auf den Zellen belassen. Anschließend wurde ein kompletter Mediumwechsel vollzogen. Bei einer immunocytochemischen Untersuchung wurden die Zellen zwischen DIV 10- DIV 14 fixiert und gefärbt.

9.3.7 HGF STIMULATION

Für den experimentellen Ablauf der HGF Stimulation wurden die Zellen 24h vor der Fixierung behandelt. Alle Substanzen wurden vorab in NMEM-B27 Medium vorverdünnt. Das Stimulanz HGF wurde in einer Konzentration von 50ng/ml eingesetzt. Der Inhibitor PHA-665752 wurde in einer Konzentration von 1µM auf die Zellen appliziert. Da PHA in DMSO gelöst ist, wurde auch eine entsprechende Menge an DMSO (0,01%) zur Kontrolle in ein weiteres well gegeben. Für Ansätze in denen eine Vorinkubation notwendig war, wurden die Zellen zuerst für 2h mit PHA-665752 präinkubiert und anschließend mit HGF stimuliert. Grundsätzlich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Zellen ohne Behandlung und DMSO behandelten Zellen festgestellt werden.

9.3.8 RAPAMYCIN BEHANDLUNG

Der mTOR Inhibitor Rapamycin wurde mit einer Endkonzentration von 200nM (gelöst in DMSO) eingesetzt und 24h mit den Zellen inkubiert. Auch für diese Behandlung wurde eine entsprechende DMSO (0,04 %) Kontrolle mitgeführt.

9.3.9 IMMUNZYTOCHEMIE: PRIMÄRE NEURONE

Für die Färbung in 96-well Screenstar Platten wurde das komplette Kultivierungsmedium von den Zellen abgenommen und die zu fixierenden Neurone mit 100µl 4% PFA pro well für 20min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0,2% Triton-X 100, 10%BMB, 1x PBS bei Raumtemperatur für 30min blockiert. Danach wurden die Primärantikörper mit 75µl (verdünnt in 10% BMB, 1x PBS) pro well, bei 4°C, rotierend über Nacht inkubiert. Die Antikörper wurden entsprechend dem Hersteller/verfügbaren Protokollen verdünnt. Am nächsten Tag wurde jedes well vor dem Aufbringen des Sekundärantikörpers dreimal mit 1x PBS für 10min gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:400 auf die Zellen gegeben (75µl pro well verdünnt in 10% BMB, 1x PBS) und für 2h bei Raumtemperatur, schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS für 10min gewaschen und anschließend für 30min, 100µl pro well mit Hoechst gefärbt (1:1000 in PBS pro well). Zum Schluss wurden die Zellen abermals 2x mit 1x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen mit 100µl 1x PBS überschichtet und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C gelagert.

9.4 Tierversuche

9.4.1 STEREOTAKTISCHE INJEKTION IN DEN GYRUS DENTATUS DER RATTE

Zur Vorbereitung der stereotaktischen Injektion wurden die lentiviralen Suspension unter einer Steril-Werkbank herunterzentrifugiert um sicherzustellen, dass sich keine Tröpfchen im Deckel befinden. Anschließend wurden etwa 6µl des Virus in die zuvor mit destilliertem Wasser gereinigte Hamilton Spritze aufgezogen. Im Anschluss wurde das Gewicht des Tieres ermittelt um die Schmerzmittelinjektion zu berechnen. Basierend auf dem Gewicht wurde eine Spritze mit Metamizol (50mg/ml) für eine ausreichende Schmerzmittelversorgung während der Operation (pro Gramm Tier 1µl Metamizols) vorbereitet. Des Weiteren wurde eine Meloxicam Injektion vorbereitet (1-2mg/kg) um eine adäquate postoperative Schmerzmittelversorgung zu garantierend. Für die lokale Anästhesie der Kopfhaut wurde eine Lidocainspritze aufgezogen.

Nun wurde die Ratte in die Induktionskammer überführt und die Narkose durch einen 5% Isofluran-Sauerstoff-Einstrom eingeleitet. Nach Eintritt der initialen Narkose wurde die Rasur der Operationsstelle durchgeführt. Zum Schutz der Nager-Augen wurde eine Salbe aufgetragen (Bepanthen). Nach subcutaner Metamizol-Injektion wurde 20min gewartet, um eine ausreichende Analgesie für den Start der Operation sicherzustellen. Für die Durchführung der Operation wurde das Tier in den stereotaktischen Apparat mittels Ohrstiften und Schneidezahnvorrichtung eingespannt und die Inhalationsmaske zum Einstrom der Isofluran-Anästhesie angelegt. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde eine 1,5 - 3,5% Vol. Isofluran/O₂-Gemisch bei ca. 1mbar dem Tier zugeführt.

Sobald eine ausreichende Narkose erreicht wurde (Überprüfung durch Zwischenzehenreflex), wurde die Operationsstelle mit Vet-Sept®-Lösung desinfiziert und das Lokalanästhetikum (2% Lidocainhydrochloridlösung) aufgetropft. Zum Öffnen der Kopfhaut wurde ein Skalpell verwendet. Es wurde ein medianer Längsschnitt von 1-1,5cm Länge gesetzt und die eröffnete Stelle abermals mit 2% Lidocainhydrochloridlösung betäubt. Nun wurde die Wundöffnung durch beidseitiges Anbringen von Bulldog-Klemmen fixiert und die Schädeldecke durch Entfernen des verbliebenen Bindegewebes mittels Skalpell freigelegt und gereinigt. Die dadurch entstandenen leichten Blutungen wurden durch sterile Wattestäbchen gestoppt. Vor dem Ermitteln der korrekten Koordinaten wurde die Lagerung des Kopfes in der Längsachse überprüft (Bregma und Lambda auf gleicher horizontaler Ebene).

Tabelle 9: Injektionskoordination in den Gyrus Dentatus einer adulten Ratte

Abzüge	ausgehend	von	Angaben in cm
Bregma			
anterior/ posterior			0,29
medial/ lateral			+0,25/ -0,25
dorsal/ ventral			0,43

Gegebenenfalls wurde eine Nachjustierung mit Hilfe der Schneidezahnvorrichtung vollzogen. Die bereits vorbereitete Hamiltonspritze wurden nun in den elektronisch ansteuerbaren Halter eingespannt und zur Bestimmung der Bregma-Koordinaten und Berechnung der bilateralen Injektionskoordinaten in Referenz zu Bregma verwendet. Mit einem Bleistift wurden die Markierungen der ermittelten Trepanationsloci markiert.

Für die Kraniotomie wurde ein Dremel verwendet mit einem Boraufsatz von 1mm Durchmesser. Im Anschluss wurde die Hamiltonspritze in die Schädelöffnung in dorsoventraler Richtung vorsichtig abgesenkt. Um eventuelle Bewegungen des Gewebes, die durch das Einbringen der Nadel verursacht wurden, zu vermeiden wurde 5min abgewartet und dann die tatsächlichen Koordinaten notiert. Die Injektion der lentiviralen Suspension (2 µl) wurde durch einen vollautomatischen Kolbenvortrieb (0,2 µl/min) durchgeführt. Nach dem Einbringen des Virus wurde abermals 5min gewartet. Die Spritze wurde langsam zurückgeführt und der Injektionsprozess an der kontralateralen Hemisphäre wiederholt. Um die Schädeldecke zu reinigen wurde Ringerlösung vorsichtig aufgetropft und abgetupft und die Bulldog-Klemmen entfernt. Die Wunde wurde durch eine Operationsnaht verschlossen und mit Vet-Sept® Lösung desinfiziert. Für eine postoperative Analgesie wurde Meloxicam injiziert. Durch das Absetzen der Inhalationsnarkose und Entfernen des Tieres aus der stereotaktischen Apparatur wurde das Aufwachen aus der Narkose eingeleitet. Zum Zweck einer initialen postoperativen Schmerzversorgung wurde zusätzlich eine Buprenorphin Injektion (Temgesic®; 0,1 mg/kg s.c.) gesetzt.

Die Tiere wurden direkt nach der Operation in Einzelkäfige gesetzt und durch eine Trinkversorgung mit 2,5 mg/l Buprenorphin ad libitum über Nacht behandelt. Gegebenenfalls wurde 2-3 Tage nach der Operation eine weitere, subkutane Injektion verabreicht sowie eine mit Buprenorphin versetzte Trinkversorgung über Nacht gewährleistet. Etwa 4 Tage nach der Operation wurden die isoliert gehaltenen Tier in Gruppen zusammengeführt.

9.4.2 TRANSKARDIALE PERFUSIONSFIXIERUNG

Zur Vorbereitung der Perfusion wurde das Pumpsystem und der Schlauch mit 100ml PBS gespült und die Pumpgeschwindigkeit auf 31ml/min eingestellt. Das zu perfundierende Tier wurde gewogen um das Narkotikum und Anästhetikum anzusetzen (Xylavet 10mg/kg/ Ketamin 100mg/kg).

Im Anschluss wurde das Narkotikum/ Anästhetikum intraperitoneal verabreicht und das Einsetzen der Narkose mittels Reflex-Tests überwacht. Bei Bedarf wurde eine zusätzliche Verabreichung von Narkotika appliziert. Nach dem Eintritt eines tiefen, narkotischen Zustands wurde das Tier auf dem Rücken auf eine Styroporunterlage platziert und die Vorder- und Hinterläufe mit Hilfe starker Kanülen fixiert. Die Hautpartie unterhalb des Sternums wurde mit einer groben Pinzette angehoben und der Bauchraum durch einen kräftigen Scherenschnitt geöffnet.

Um den Thoraxraum komplett zu öffnen, wurden seitliche Schnitte entlang der Rippenbögen bis zum Ansatz der Vordergliedmaßen gemacht. Die Rippenbögen wurden durch Fixierung des Thoraxdeckels mittels Hemostat in anteriorer Position fixiert. Das Zwerchfell und Perikard wurden mit einer feinen Schere durchtrennt und zur Seite geschoben. Der schlagende Herzmuskel wurde am posterioren Ende mit einer groben Pinzette gehalten und leicht nach unten gezogen. Die Kanüle wurde in die linke Herzkammer/linken Vorhof eingeführt. Zeitgleich wurde die rechte Herzkammer durch einen Schnitt mit einer feinen Schere geöffnet und die Perfusion gestartet.

Das Gefäßsystem wurde mit etwa 200 ml 1x PBS pH 7,4 durchspült. Während des Spülens wurde der Flüssigkeitsaustritt aus der rechten Herzkammer sowie die Leberfärbung kontrolliert. Nach dem Durchlauf der 200ml wurde die Perfusionspumpe gestoppt und der Wechsel des Pumpen-Ansaugschlauches in 4 % (w/v) PFA/PBS pH 7,4 Lösung vollzogen. Die Perfusionspumpe wird abermals gestartet. Die Gewebefixierung wurde über Prüfung der Festigkeit der Leber kontrolliert. Zum Schluss wurde die Perfusionspumpe gestoppt, das Gehirn entnommen und für 1h rotierend in PFA bei 4°C weiterfixiert und dann in PBS Natriumazid bei 4°C gelagert.

9.4.3 VIBRATOMSCHNITTE

Vorbereitend wurden entsprechend der Schnitte 24-well-Platten mit 1000µl PBS + 0.1% Natriumazid pro well bereitgestellt. Das Gehirn wurde im Vorfeld getrimmt, das Kleinhirn und 3-4mm des Vorderhirns beginnend vom Bulbus Olfactorius wurden entfernt. Das getrimmte Gewebstück wurde

mit Hilfe eines Gewebeklebers auf die magnetische Schnittplatte aufgebracht (der rostrale Abschnitt zeigte nach oben), sodass coronale Schnitte gefertigt werden konnten. Das Schneiden wurde mit dem Vibratom VT1000S (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) unter folgenden Parametern begonnen:

Schnittfrequenz: 6, Geschwindigkeit: 3, Schnittdicke: 50-75µm. Für eine feine Schnittgenauigkeit wurden stets frische Rasierklingen (Feather New Hi-Stainless, Japan) verwendet.

Intakte Schnitte wurden in die bereits vorbereitete 24-well-Platte überführt und mikroskopisch auf eine Fluoreszenz im Bereich des Gyrus Dentatus im 488nm Kanal hin überprüft.

9.4.4 IMMUNHISTOCHEMIE

Vor der Färbung wurden die Hippocampi aus den Gewebsschnitten isoliert, um später ein besseres Ergebnis beim Eindeckeln der Proben zu erzielen. Die Schnitte wurden schwimmend in einer 24-well-Platte für 30min in vorgewärmten 10mM Natrium Citrat Puffer bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 2x in 1xPBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte für 2h in 0,5% Triton-X100/1xBMB/PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert und blockiert (500µl/well). Das Blockingreagenz wurde abgenommen und der Primärantikörper (300µl/well in 1xBMB/1xPBS verdünnt) über 2 Tage bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Bevor der Sekundärantikörper hinzugegeben wurde, wurden die Schnitte 3x für 5min in 1x PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde mit den Schnitten ebenfalls in 1xBMB/1xPBS verdünnt und für 24h abgedunkelt, auf einer Wippe inkubiert. Nachfolgend wurde der Sekundärantikörper abgenommen und die Schnitte 2x in 1xPBS gewaschen. Eine Kernfärbung wurde mit Hoechst 33258 erzielt (300µl/well, 1:1000 in PBS, abgedunkelt). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte auf einen Glasslide überführt, mit DAKO Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt und anschließend mit Nagellack umrandet (über Nacht abgedeckt trocknen lassen).

9.5 Auswertungsroutinen

9.5.1 MIKROSKOPIE/ AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE/ IMMUNCYTOCHEMIE

Für die mikroskopische Analyse wurde der Cell Observer SD Mikroskop (Zeiss) verwendet. Dabei wurde hauptsächlich mit dem 63x/1.40 Immersionsöl DIC M27 Objektiv gearbeitet, mit welchem z-Stapel aufgenommen wurden. Die einzelnen Bilder des Stapels wurden in einem Abstand von 0,24µm aufgenommen. Die Emissionswellenlängen der gefärbten Proben wurden bei 673nm, 572nm, 509nm, 465nm detektiert.

Für die Auswertung wurde IMARIS 8.2 Software verwendet. In allen Aufnahmen wurde falls notwendig, einheitlich für jedes Experiment eine Hintergrund Subtraktion durchgeführt. Um die teils punktuellen

Strukturen der synaptische Marker zu quantifizieren wurden Masken erstellt für spezifische Zellsegmente der primären Neurone. Zur Definition dieser „Region of Interest“ (RoI) wurde die lentivirale EGFP Fluoreszenz oder das MAP2 Signal des proximalen Dendrits (25µm) verwendet. Für die zu analysierenden Marker der RoIs wurden separate Masken kreiert. Um eine Quantifizierung der synaptischen Marker zu ermöglichen wurde die Anzahl der detektieren Signal in dem definierten Segment errechnet.

Für die immuncytochemische Quantifizierung der cMet, TSC2 Expression und S6Kinase Phosphorylierung wurde als RoI das Soma definiert. In diesem Fall wurde die mittlere Intensität des Fluoreszenzmarkers bestimmt.

9.5.2 STATISTIK

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 8.0.1. Alle Daten wurden auf eine Gaußsche Normalverteilung hin getestet. Um die Verteilung der Daten zu beurteilen, wurde der D'Agostino-Pearson und Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde 5 % gewählt. Die p-Werte < 0,05 *, < 0,01 ** wurden als signifikant und p-Werte < 0,0001 als hochgradig signifikant (***) bewertet. In allen Abbildungen wurde der Standardfehler eingezeichnet.

Jedes *in vitro* Experiment wurde 3-mal unabhängig durchgeführt, für die *in vivo* Experimente wurden pro knock down Konstrukt 3 Tiere verwendet und die Daten gepoolt.

10 ERGEBNISSE

10.1 Die Rezeptortyrosinkinase cMet ist beteiligt an der Regulation inhibitorischer Synapsen

Durch ein siRNA Screening wurden potentielle Rezeptortyrosinkinasen (RTK) identifiziert, die an der Regulation von Gephyrin beteiligt sind [45]. Neben der RTK EphA7 ist auch der Rezeptor cMet in Erscheinung getreten [46]. In der Literatur wurde cMet bislang an exzitatorischen Synapsen lokalisiert [51]. Powell et al. zeigte, dass transgene MET-EMX1 Knockdown Mäuse eine Reduktion postsynaptischer Inhibition in thalamocorticalen Arealen aufweisen [69]. Dies stellt einen Hinweis auf eine reduzierte Dichte von GABA_A Rezeptoren dar, welches wiederum in der Reduktion des Gerüstproteins Gephyrin begründet sein könnte.

10.1.1 CMET IST IN RÄUMLICHER NÄHE ZU DEN POSTSYNAPTISCHEN MARKERN GEPHYRIN UND PSD95

Um einen Eindruck über die Lokalisation exzitatorischer und inhibitorischer Marker im Kontext der Rezeptortyrosinkinase cMet zu gewinnen wurden hippocampale Kulturen an DIV10 fixiert und nach cMet sowie expliziten synaptischen Markern gefärbt. Neben einer MAP2 (Mikrotubuli-assoziierte Protein) Färbung zur Darstellung der neuronalen Zelle, wurde die Rezeptortyrosinkinase angefärbt. Für die Darstellung exzitatorischer Postsynapsen wurde PSD95 eingesetzt und für die Visualisierung inhibitorischer Postsynapsen Gephyrin. Qualitativ lässt sich die RTK cMet immunhistologisch im Gyrus Dentatus der Ratte nachweisen (Abbildung 5). Sowohl für Gephyrin als auch für PSD95 konnte eine deutliche, räumliche Nähe zu der Rezeptortyrosinkinase cMet *in vitro* festgestellt werden (siehe Abbildung 6).

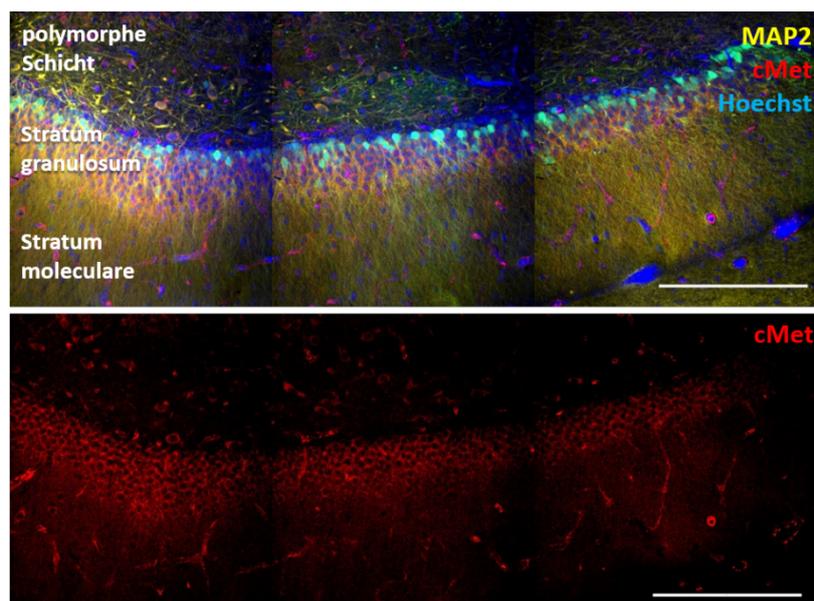


Abbildung 5: cMet Immunfluoreszenz im Gyrus Dentatus der Ratte

Zu sehen ist das Körnerzellband im Gyrus Dentatus einer drei Monate alten Ratte (histologischer Schnitt 50µm). Die Neurone wurden mit MAP2 angefärbt. Im dicht gepackten Bereich der Zellkörper (Stratum granulosum) sowie im Bereich der Dendriten (Stratum moleculare) sieht man ein deutliches Fluoreszenzsignal für die immunhistologische Färbung gegen die Rezeptortyrosinkinase cMet. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

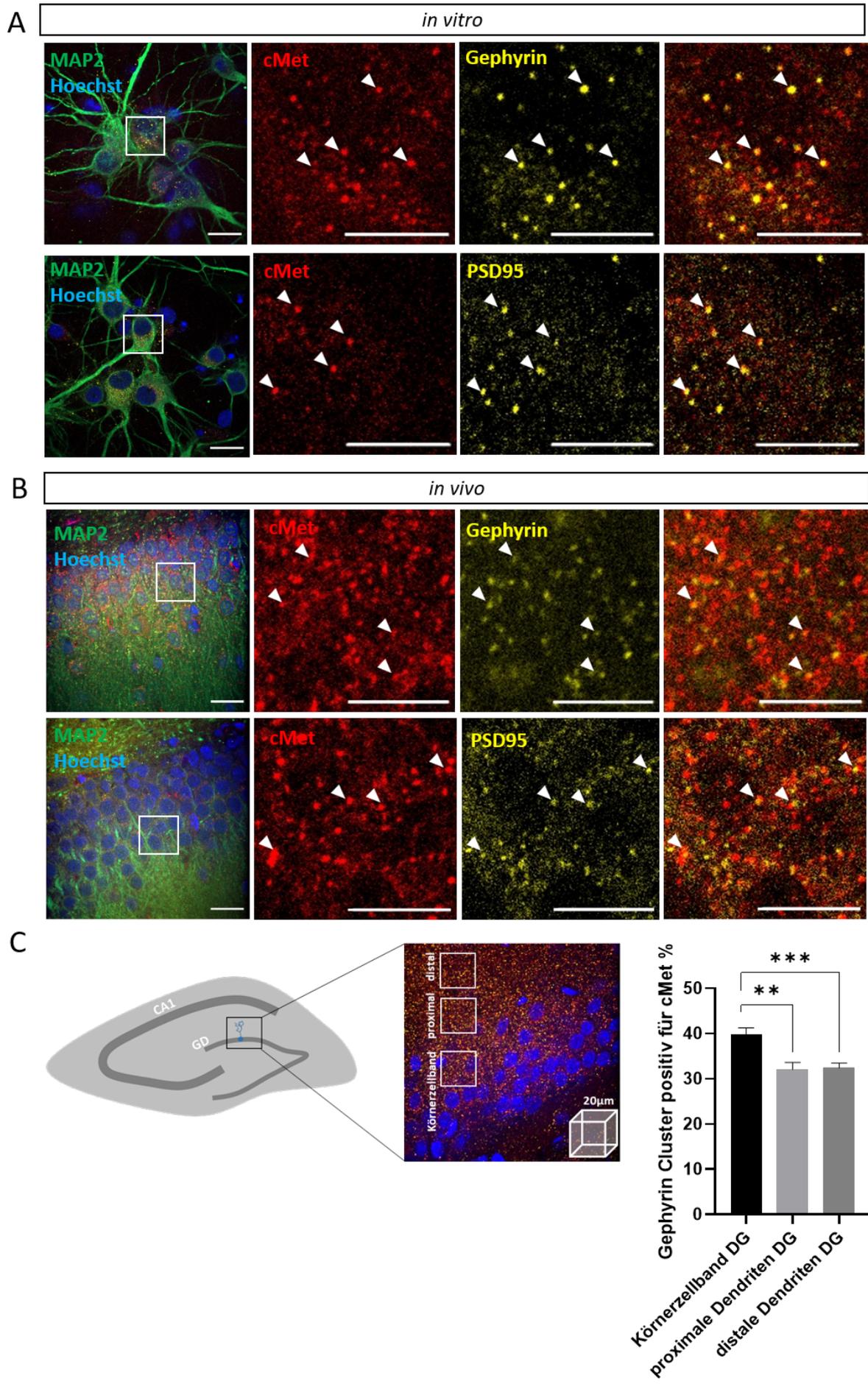


Abbildung 6: Status quo Analyse der Lokalisation von cMet und den Markern Gephyrin und PSD95

Neben den Originalaufnahmen aus hippocampalen *in vitro* Kulturen DIV10 (A) sind Originalaufnahmen aus histologischem Gewebe zu sehen (B) (63x Öl Immersion; z-Stapel; Cellobserver). Gefärbt wurden MAP2 (grün), cMet (rot), PSD95/ Gephyrin (gelb), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkern. In den jeweiligen Vergrößerungen ist die isolierte Fluoreszenz von cMet/ PSD95/Gephyrin gezeigt. Zudem wird auch ein Komposit aus der cMet Färbung und PSD oder Gephyrin gezeigt. Weiße Pfeile deuten auf kolokalisierende Signale. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. C: Schematische Darstellung des Analyse Bereichs im Gyrus Dentatus; unterteilt in Körnerzellband, proximalen und distalen Bereich. Statistische Analyse der Gephyrin/ cMet Kolokalisation. ANOVA; Tukey's Test, $F(2,30)=0.3092$, P-Wert 0.0016 = **, P-Wert < 0.0001 = ***, GC n=11, proximal n=11 , distal n=11; Fehlerbalken=SEM.

Zur Überprüfung, ob eine Kolokalisation ebenfalls *in vivo* detektiert werden kann, wurden histologische Schnitte untersucht. Zu diesem Zweck wurden Gehirnschnitte von unbehandelten, adulten Ratten (3 Monate) gefertigt, immunocytochemisch gefärbt und mit Hilfe des Cellobservers mikroskopiert. Ergänzend zu der *in vitro* Färbung, ließ sich auch in den histologischen Schnitten eine räumliche Nähe sowohl für PSD95 bestätigen als auch für Gephyrin neu detektieren. Um mögliche Unterschiede der Lokalisation von Gephyrin und cMet innerhalb der subzellulären Kompartimente des Neurons zu erkennen, wurde der Bereich des Körnerzellbandes, der die Somata enthält, mit proximalen und distalen, dendritischen Bereichen verglichen. Das Fluoreszenzsignal von Gephyrin und cMet wurde durch die IMARIS Bitplane Software analysiert und kolokalisiert. Die Quantifizierung des Signals wurde ausgehend vom Körnerzellband des Gyrus Dentatus in 8000 µm³ großen Kubus förmigen Strukturen durchgeführt. Grundsätzlich ließen sich die Fluoreszenzsignale für Gephyrin und cMet miteinander kolokalisieren. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass im Körnerzellband signifikant mehr cMet positive Gephyrin-Signale als in den proximalen und distalen Bereichen zu finden waren.

10.1.2 MRNA EXPRESSION VON CMET NACH KNOCKDOWN REDUZIERT *IN VITRO*

Die Kollokalisierung legt nahe, dass cMet an der Gephynclustering beteiligt ist. Um das zu prüfen, wurden lentivirale Knockdown-Vektoren konzipiert und die Expression der Rezeptortyrosinkinase gezielt herunterreguliert. Es wurden zwei unabhängige Konstrukte entwickelt, um „Off-target-Effekt“ auszuschließen. Die Knockdown-Sequenz umfasste eine microRNA (miRNA), die mit endogener mRNA interferiert, was zu einer Degradation der selbigen führt. Die Sequenzen wurden in einen Vektor überführt, der die miRNA unter einem Calcium/ Calmodulin KinaseII Promotor und somit spezifisch in Neuronen exprimiert. Zusätzlich enthielt der Vektor eine EGFP („enhanced green fluorescent protein“) Expressionskassette, die unter der Kontrolle eines Synapsin-Promotors abgelesen wird und die Detektion transduzierter Zellen ermöglicht. Daraus ergaben sich die lentiviralen Konstrukte pLenti04/CAMKII/mi3923/SEW mit einer interferierenden miRNA an Stelle 3923 der cMet mRNA und das Konstrukt pLenti04/CAMKII/miUTR/SEW mit einer interferierenden miRNA im untranslatierten Bereich.

Zur Quantifizierung des Knockdowns wurde die endogene mRNA Expression nach Transduktion von *in vitro* Kulturen mit Hilfe einer TaqMAN Analyse gemessen. Cortikale Zellen wurden an DIV3 mit den lentiviralen Suspensionen infiziert. Nach 2-tägiger Inkubation wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt um den Großteil des Virus aus dem Medium zu entfernen. Danach verblieben die Zellen für weitere 12 Tage in Kultur. Nachdem die Transduktionseffizienz des EGFP fluoreszierenden lentiviralen Konstrukts mittels Mikroskopie überprüft worden ist, wurden die Zellen lysiert und mit einer quantitativen real time PCR analysiert. In der statistischen Analyse zeigte sich eine signifikante Reduktion des endogenen cMet mRNA Gehalts für beide Knockdown Konstrukte. Konstrukt mi3923 wies eine Reduktion auf 46% auf, während die interferierende RNA in der untranslatierten Region (miUTR) den mRNA Gehalt von endogenem cMet auf 66% reduzierte (Abbildung 7).

Beide Konstrukte zeigten eine deutliche Reduktion des mRNA Gehalts *in vitro*.

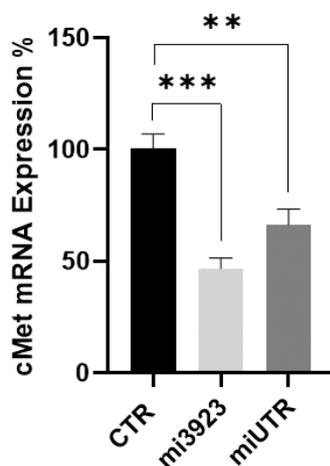


Abbildung 7: cMet mRNA Gehalt nach Transduktion corticaler primärer Neurone

Gezeigt ist der statistisch quantifizierte mRNA Gehalt corticaler Neurone an DIV14, nach viraler Transduktion an DIV3 mit den Konstrukten mi3923 und miUTR im Vergleich zu einer miCTR Transfektion. One-way ANOVA + Dunnett's Test; $F(2,43)=0.5996$, P-Wert < 0.0001 = ***; P-Wert 0.0019 = **, miCTR n=22, mi3923 n=14, miUTR n=10, Fehlerbalken=SEM.

10.1.3 REDUKTION DER RTK CMET AUF PROTEINEBENE *IN VITRO*

Um die reduzierte Expression von cMet auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden primäre hippocampale Neurone an DIV3 mit den lentiviralen Konstrukten infiziert. Nach dem Fixieren der Zellen an DIV10 wurde eine immunocytochemische Färbung angefertigt um das verbleibende endogene cMet Signal sichtbar zu machen. Im Anschluss wurde die mittlere Intensität der Anregung bei 545nm (Cy3 Signal) über die Zen Software bestimmt. Dazu wurde eine „Region of Interest“ um das Soma des Neurons gelegt und das darin enthaltene Signal quantifiziert (Abbildung 8). Die statistische Auswertung der Analyse bestätigte eine Reduktion der immunocytochemischen cMet Fluoreszenz. Das Signal für das Konstrukt mi3923 wurde im Vergleich zu Kontroll- transduzierten Zellen auf 81%, für das Konstrukt miUTR auf 68% reduziert.

Zusammenfassend konnte mit beiden Knockdown Konstrukten eine signifikante Reduktion der cMet Expression auf Protein- und mRNA-Ebene *in vitro* gezeigt werden (Abbildung 8D).

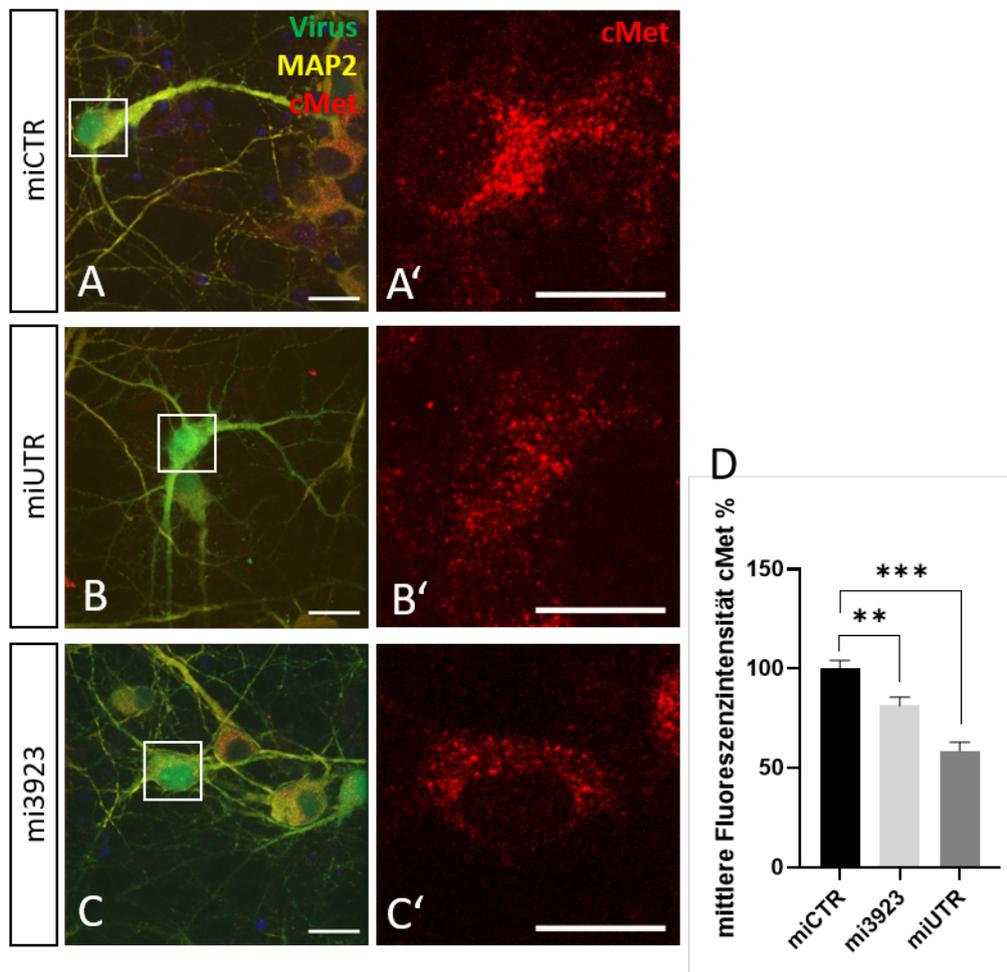


Abbildung 8: Immunocytochemische Quantifizierung des cMet Signals nach Knockdown *in vitro*
 A-C zeigen exemplarische, viral transduzierte Zellen (miCTR, mi3923, miUTR). Färbung: MAP2 (gelb), cMet (rot), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. In der Vergrößerung ist die isolierte Fluoreszenz von cMet im Soma dargestellt (A', B', C'). Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. D: Statistische Analyse der mittleren Intensität von cMet. One-way ANOVA + Dunnett's Test; $F(2,191)=4.948$, P-Wert 0.0065 = **, P-Wert < 0.0001 = ***; miCTR n=103, mi3923 n=50, miUTR n=42; Fehlerbalken=SEM.

10.1.4 KNOCKDOWN DER RTK BEWIRKT EINE REDUKTION DER GEPHYRINCLUSTERUNG *IN VITRO*

Die Effizienz des cMet Knockdowns konnte sowohl auf Translations-, als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Im folgenden Experiment wurde näher untersucht, ob sich bereits in primären Kulturen, einem Zellkultursystem welches die embryonale Neurogenese abbildet, Effekte auf die Regulation synaptischer Marker feststellen lassen. Es wurde die Dichte sowohl post-, als auch präsynaptischer Marker quantifiziert. Exemplarisch für Proteine inhibitorischer Synapsen wurde präsynaptisch VGAT und postsynaptisch Gephyrin analysiert. Um die Dichte exzitatorischer Marker zu quantifizieren wurde präsynaptisch nVGluT (vesicular glutamate Transporter) und postsynaptisch PSD95 (postsynaptic density protein 95) immunocytochemisch gefärbt.

Analysiert wurde der proximale Dendrit (Abbildung 9 A',B',C') primärer, hippocampaler Neurone, da dieser auf 25µm die beste Messstrecke zeigte. Wie in den vorherigen Experimenten wurden die Zellen an DIV3 viral transduziert. Nach dem Fixieren an DIV 10 wurden die Zellen immunocytochemisch gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurde mit Hilfe der IMARIS Bitplane Software analysiert. Dabei wurde am proximalen Dendrit eines transduzierten Neurons eine „Region of Interest“ definiert. Das darin enthaltene EGFP Signal des Virus bildete die Grundlage für eine Maske des zu analysierenden Kompartiments. Die synaptischen Marker (Gephyrin, VGAT, PSD95 und VGluT) wurde ebenfalls maskiert. Im Anschluss wurden alle Cluster innerhalb des definierten proximalen Bereichs des Dendriten ausgezählt.

In der statistischen Auswertung (Abbildung 9) ergab sich eine signifikante Reduktion der postsynaptischen Gephyrincluster für das mi3923 und das miUTR Konstrukt auf jeweils 73% im Vergleich zur Kontrolle. Für alle weiteren Marker konnte keine signifikante Änderung gemessen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die konstruierten, lentiviralen Konstrukte mi3923 und miUTR eine signifikante Reduktion der Gephyrinclusterung an der Membranoberfläche hippocampaler Neurone *in vitro* induzierten.

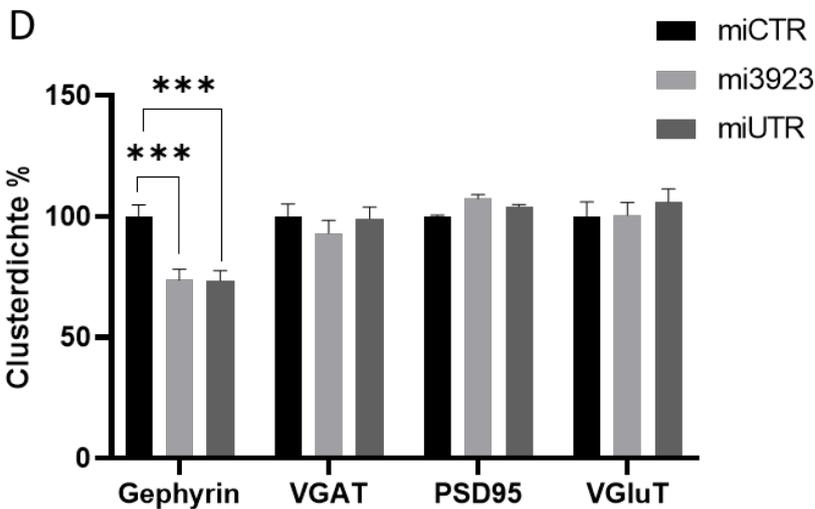
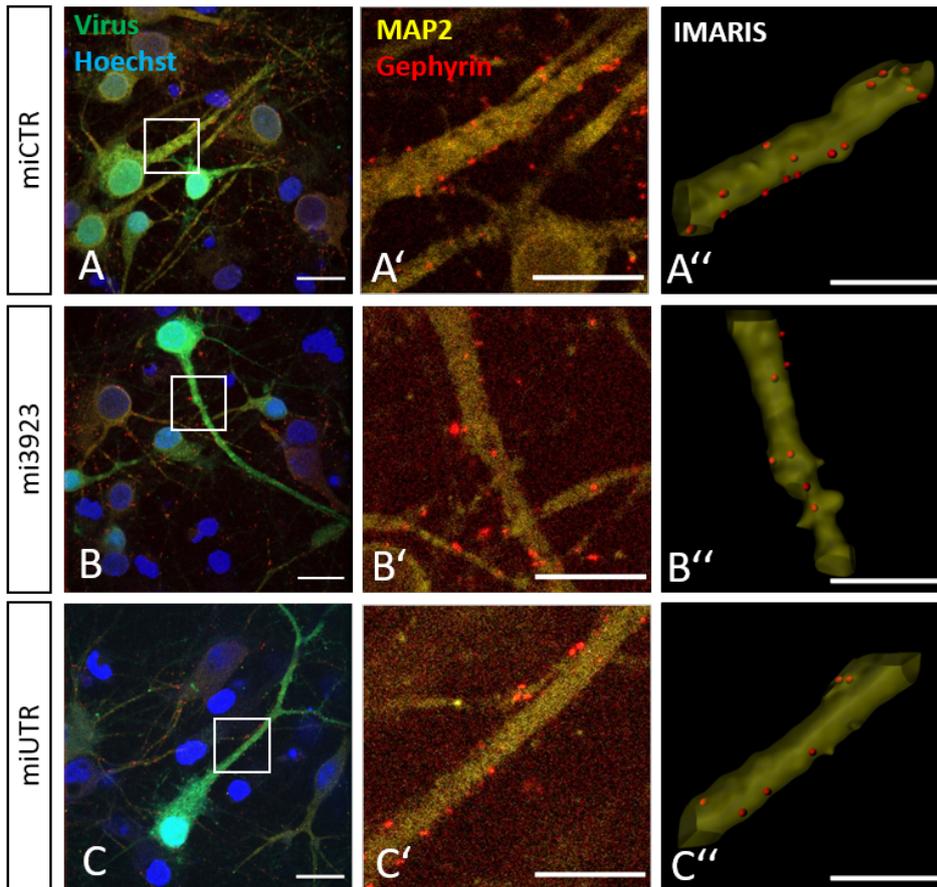


Abbildung 9: Immunocytochemische Quantifizierung synaptischer Marker nach Knockdown *in vitro*
A-C zeigen exemplarische, viral transduzierte, hippocampale Zellen (miCTR, mi3923, miUTR). Gefärbt wurde MAP2 (gelb), Gephyrin (rot). Viral transduzierte Zellen sind in grün dargestellt, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Neben den mikroskopischen Aufnahmen in **A**, **B** und **C** ist eine Vergrößerung des analysierten proximalen Dendrits mit den Färbungen MAP2 und Gephyrin zu sehen (**A'**, **B'**, **C'**). Eine exemplarische IMARIS Bitplane Darstellung zeigt 25μm des maskierten proximalen Dendriten und die ebenfalls maskierten punktförmigen Gephyrin Strukturen (**A''**, **B''**, **C''**). Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20μm, der Vergrößerung 10μm. **D**: Statistische Analyse der synaptischen Cluster. Two-way ANOVA + Tukey's Test, $F(2, 608) = 1,895$, P-Wert $< 0.0001 = ***$; Gephyrin: miCTR n=69, mi3923 n=80, miUTR n=71; VGAT: miCTR n=45, mi3923 n=41, miUTR n=44; PSD95: miCTR n=45, mi3923 n=45, miUTR n=45; VGLuT: miCTR n=46, mi3923 n=44, miUTR n=45; die Analyse der synaptischen Marker VGAT, PSD95 und VGLuT ergab keine signifikante Veränderung; Fehlerbalken=SEM.

10.1.5 KNOCKDOWN DER RTK CMET BEWIRKT EINE REDUKTION VON CMET AUF PROTEINEBENE *IN VIVO*

Nachdem die *in vitro* Analysen darauf hingewiesen haben, dass die Rezeptortyrosinkinase cMet die Dichte des inhibitorischen Markers Gephyrin beeinflusst, wurden die komplementierenden *in vivo* Experimente eingeleitet. Zu diesem Zweck wurden stereotaktische Injektionen kontralateral in den Gyrus Dentatus von drei Monate alten, weiblichen Ratten durchgeführt. Über eine Hamilton-Spritze wurden jeweils 2µl der Virus-Suspension (pLentiC4miCTRSEW/ pLentiC4mi3923SEW/ pLentiC4miUTRSEW) in die kontralateralen Hemisphären des Gehirns appliziert. Zwei Wochen nach der Injektion wurde das Gehirn nach einer transkardialen Perfusionsfixierung entnommen. Im Bereich des Hippocampus wurden coronale Vibratom-Schnitte mit einer Schnittdicke von 50µm angefertigt. Bevor die Schnitte gefärbt wurden, wurde mikroskopisch sichergestellt, dass die grüne Fluoreszenz der SEW Kasette des lentiviralen Konstrukts im Gyrus Dentatus exprimiert wurde. Für die nachfolgenden Färbungen wurden Schnitte mit einem deutlichen EGFP Fluoreszenz verwendet. Anschließend wurden die Schnitte immunhistologisch nach cMet und MAP2 gefärbt, mit dem Cell Observer mikroskopiert und ausgewertet. Alle *in vivo* Analysen des Knockdown Experiments wurden durchgeführt mit lentiviral transduzierten Neuronen im Stratum granulosum. Ähnlich der *in vitro* Analyse wurde eine „Region of Interest“ um das Soma eines transduzierten Neurons definiert und die mittlere Fluoreszenzintensität im Cy3 Kanal von cMet analysiert. Die Daten von drei injizierten Tieren einer Injektions-Gruppe wurden jeweils gepoolt, lediglich für das Konstrukt miUTR konnten nur zwei korrekt injizierte Tiere in die

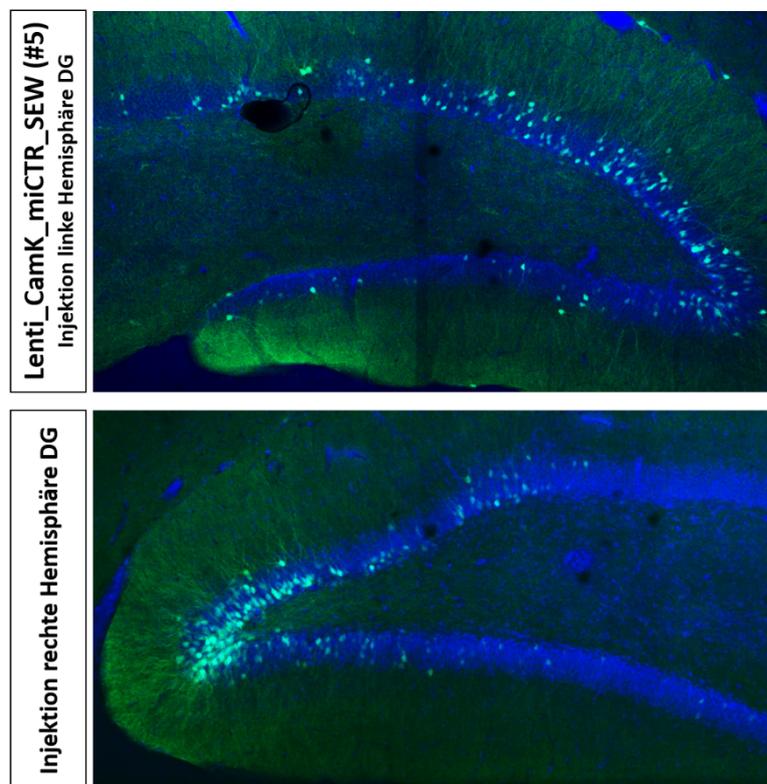


Abbildung 10: Exemplarische Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte

Gezeigt ist die lentivirale Injektion des Konstrukts plentiC4miCTRSEW in den Gyrus Dentatus einer drei Monate alten, weiblichen Ratte. Injiziert wurden 2µl der lentiviralen Suspension mit Hilfe einer Hamiltonspritze. Zwei Wochen nach der Injektion wurde das Gewebe nach einer transkardialen Perfusionsfixierung entnommen. Im Anschluss wurde das Gewebe gefärbt. In Grün die Fluoreszenz des lentiviralen Konstrukts; Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne.

Analyse miteinbezogen werden. Eine Einzelanalyse der Tiere wurde ebenfalls durchgeführt (siehe Anhang: Abbildung 28).

In Abbildung 10 ist die Injektion des lentiviralen CTR Konstrukts im Gyrus Dentatus von Tier #5 zu sehen. Sowohl die rechte, als auch die linke Hemisphäre wurden in ausreichendem Maß mit der lentiviralen Suspension transduziert. Die infizierten Zellen sind in grün dargestellt, die Hoechst Färbung zeigt das Stratum granulosum des Gyrus Dentatus. Die Dendriten der darin enthaltenen, infizierten Körnerzellen ziehen strahlenförmig in den Bereich des Stratum moleculare.

Abbildung 11 A und B zeigt exemplarische Originalaufnahmen der Färbung in histologischen Schnitt des Gyrus Dentatus. Das cMet Signal wurde im Soma der Neurone quantifiziert. Durch die statistische Analyse konnte gezeigt werden, dass durch die Knockdown Injektion eine signifikante Reduktion des cMet Signals im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden konnte. Das cMet Signal in den mit mi3923 injizierten Tieren wurde auf durchschnittlich 70,7% reduziert, während das cMet Signal der mit miUTR injizierten Tiere signifikant auf 62% des Ausgangsniveaus reduziert wurde.

Beide Konstrukte zeigten eine signifikante Reduktion der immuncytochemischen Proteinfärbung nach cMet Knockdown und bestätigen zu den *in vitro* Experimenten die Funktionalität der viralen RNA Interferenz *in vivo*.

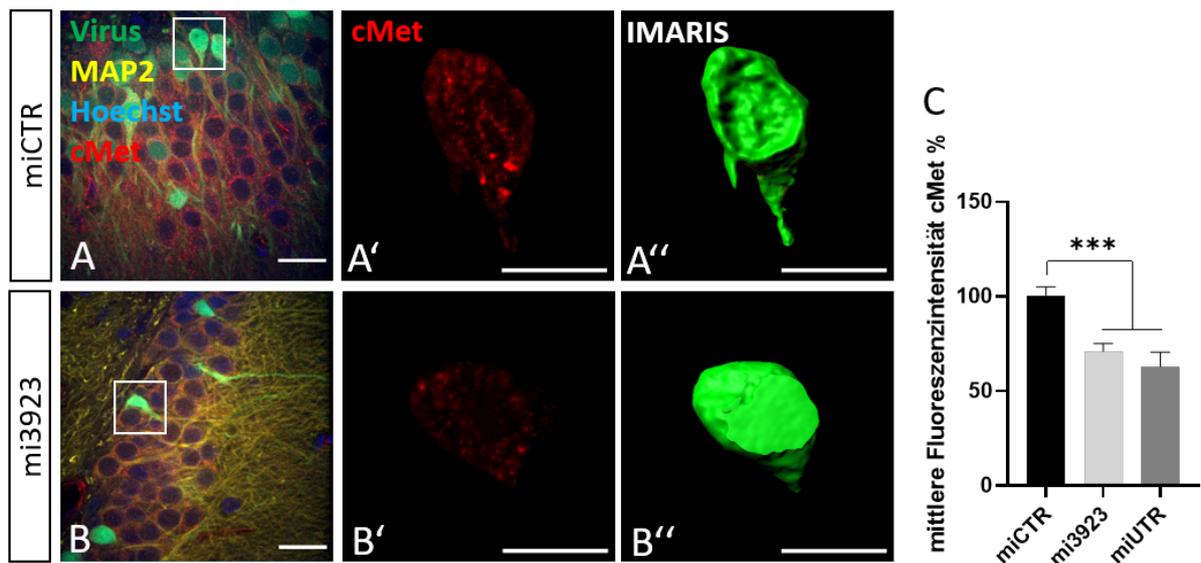


Abbildung 11: Immunocytochemische Quantifizierung des cMet Signals nach Knockdown *in vivo*

A und B zeigen exemplarische, viral (miCTR, mi3923) transduzierte Zellen aus dem GD der Ratte. Färbung: MAP2 (gelb), cMet (rot), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. In der Vergrößerung ist das isolierte cMet Signal im Soma gezeigt (A', B'). A'+B'' zeigt die generierte IMARIS Maskierung des Somas. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. C: Statistische Analyse der mittleren Intensität von cMet. ANOVA + Kruskal-Wallis Test, $H(2)=24.6$, P-Wert < 0.0001 =***; miCTR n=78, mi3923 n=99, miUTR n=37; Fehlerbalken=SEM.

10.1.6 KNOCKDOWN DER RTK CMET BEWIRKT EINE REDUKTION VON INHIBITORISCHEN SYNAPSEN *IN VIVO*

Im nächsten Schritt wurde geprüft, welchen Effekt die Knockdown Konstrukte auf inhibitorische und exzitatorische Marker *in vivo* haben. Exemplarisch für inhibitorische Synapsen wurde präsynaptisch VGAT und postsynaptische Gephyrin analysiert. Um die Anzahl exzitatorischer Synapsen zu quantifizieren wurde präsynaptisch nach VGluT und postsynaptisch nach PSD95 gefärbt.

Lentiviral transduzierte und miRNA exprimierende Zellen wurden an Hand der EGFP-Fluoreszenz identifiziert. Auf einem 25µm Abschnitt eines proximalen Dendrits wurde die Clusterdichte der verschiedenen Marker mittels IMARIS quantifiziert. Die Vorgehensweise war dabei ähnlich wie bereits unter 10.1.4 beschrieben.

Durch den Knockdown der Rezeptortyrosinkinase cMet wurde eine signifikante Reduktion der Gephyrincluster auf 35,7% mit dem mi3923 und auf 58,4% mit dem miUTR Konstrukt erzielt. Eine exemplarische Darstellung der Reduktion ist Abbildung 12 zu entnehmen. Im Kontext der postsynaptischen Reduktion des Gephyrin Gerüstproteins konnte ebenfalls eine Reduktion des präsynaptischen Markers VGAT analysiert werden. Das mi3923 Konstrukt erzielte eine signifikante Reduktion auf 56,2%.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Analyse der exzitatorischen Marker PSD95 und VGluT keine signifikante Veränderung im Vergleich mit Zellen aus CTR transduziertem Gewebe festgestellt werden.

Grundsätzlich konnte durch die Injektion der Knockdown Konstrukte in den Gyrus Dentatus gezeigt werden, dass bei einer verminderten Expression von cMet die Dichte der VGAT- und Gephyrincluster im adulten Hippocampus verringert wird. Somit ist die postsynaptische Expression der Rezeptortyrosinkinase cMet *in vivo* notwendig für die Stabilisierung GABAerger Präsynapsen. Ein Zusammenhang zwischen dem cMet Knockdown und exzitatorischen Synapsen konnte nicht hergestellt werden.

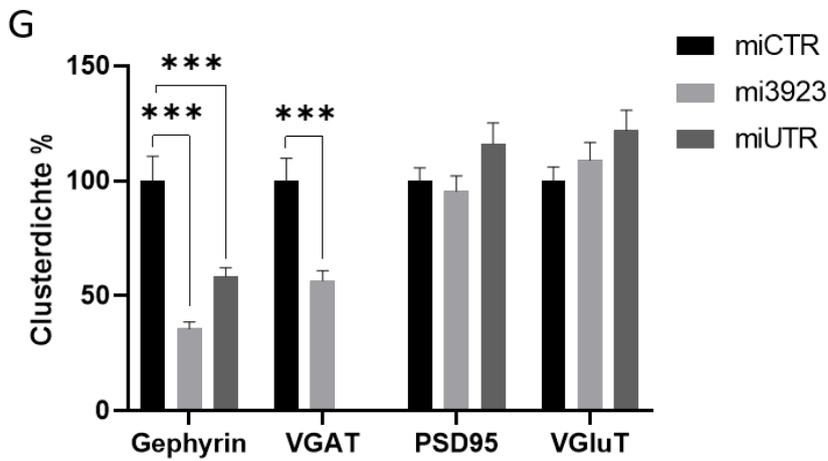
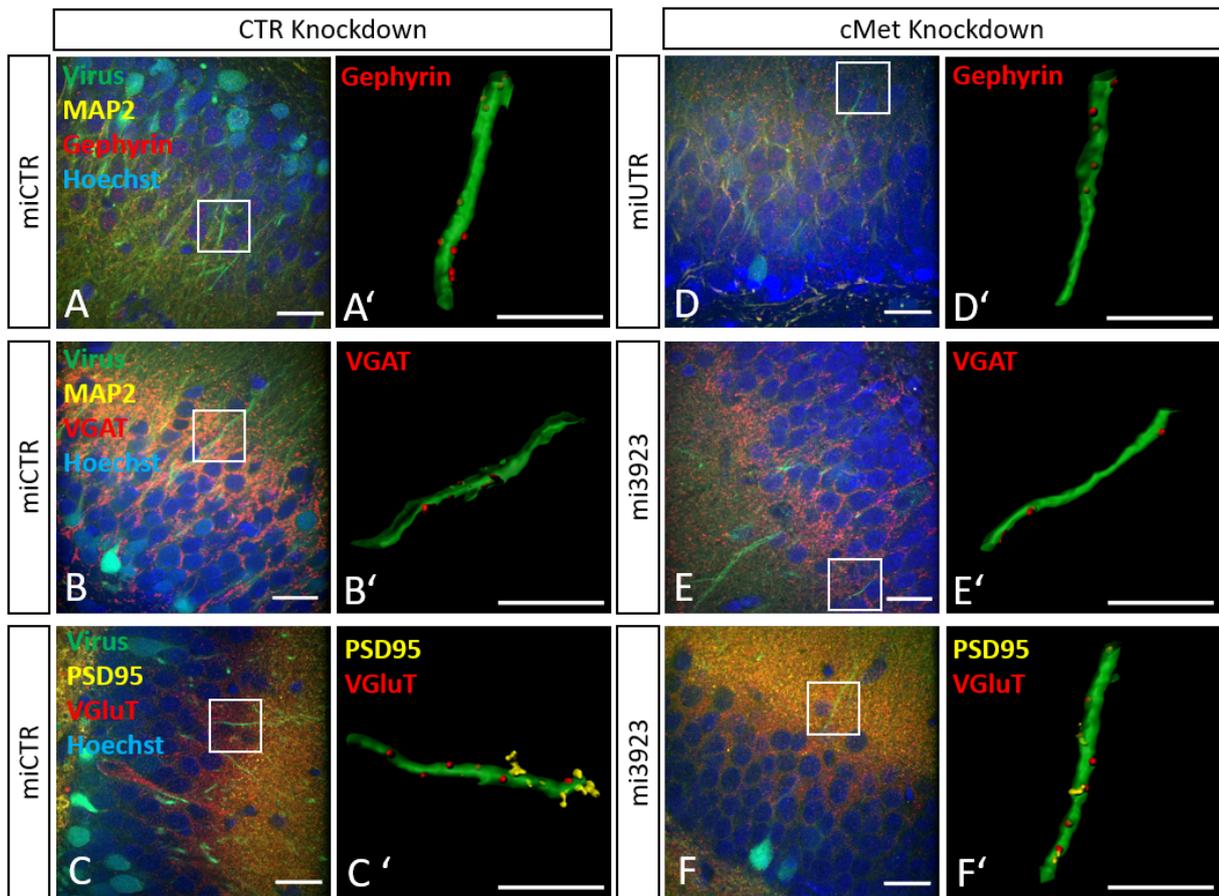


Abbildung 12: Effekt des cMet Knockdown auf synaptische Marker im Gyrus Dentatus der Ratte

A-C: Histologische Schnitte aus dem GD der CTR transduzierten Ratten. Färbungen: Gephyrin (rot), VGAT (rot), VGluT (rot), PSD95 (gelb), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Neben einer Originalaufnahme in **A, B** und **C** werden exemplarische IMARIS Bitplane Maskierungen auf 25µm eines proximalen Dendrits gezeigt (**A', B', C'**). **D-F:** gleiche Färbungen für exemplarische cMetKD transduzierte, histologische Schnitte. In den Abbildungen **D', E', F'** ist ebenfalls eine entsprechende IMARIS Maskierung zu sehen. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **G:** zeigt die IMARIS basierte Auswertung der inhibitorischen und exzitatorischen synaptischen Marker. Gephyrin: ANOVA + Kruskal-Wallis Test, $H(2)=54.51$, P-Wert $<0,0001$ *** (miCTR n=63; mi3923 n=94; miUTR n=56), VGAT: t-test + Mann Whitney Test (miCTR n=48; mi3923 n=60) P-Wert $<0,0001$ ***, PSD95: ANOVA + Kruskal-Wallis Test $H(2)=3.865$ (miCTR n=87; mi3923 n=97; miUTR n=63), VGluT: ANOVA + Kruskal-Wallis Test, $H(2)=3.462$ (miCTR n=85; mi3923 n=47; miUTR n=61) ns=nicht signifikant; Fehlerbalken=SEM.

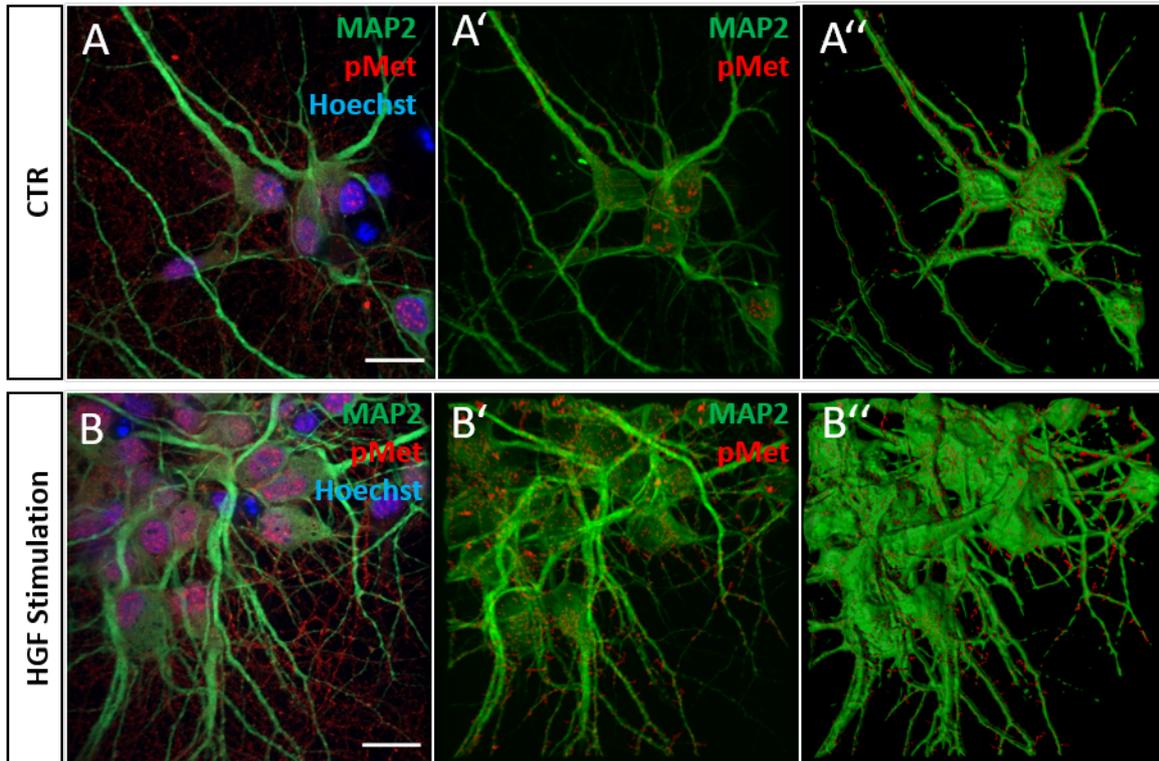
10.1.7 DER CMET REZEPTOR KANN *IN VITRO* DURCH SEINEN SPEZIFISCHEN LIGANDEN HGF INDUZIERT WERDEN

Durch die vorangegangenen Experimente wurde gezeigt, dass die cMet Expression *in vivo* für die Gephyrinclusterung notwendig ist. Um die Funktionalität und Wirkungsweise von cMet in Bezug auf nachgeschaltete Kaskaden näher zu charakterisieren wurde im nun folgenden Experiment analysiert, ob die Rezeptortyrosinkinase *in vitro* mit den spezifischen Liganden HGF stimuliert werden kann. Die Bindung des Liganden bewirkt eine Homodimerisierung des Rezeptors und eine Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste Y1234 und Y1235, welche in der katalytischen Schleife der Tyrosindomäne lokalisiert sind. Durch diesen Phosphorylierungsschritt wird eine komplexe Downstream Kaskade angestoßen, die unter anderem den RAS-ERK- und den PI3/ AKT-Signalweg induziert [49]. Der Phosphorylierungsstatus von cMet ist somit ein Indikator für dessen Aktivierung.

Hippocampale Neurone wurden an DIV9 für 24h behandelt. Mit einem Antikörper, der die Phosphorylierung an den Tyrosinresten Tyr1230, Tyr1234 und Tyr1235 detektiert, wurden die Neurone angefärbt, mit dem Cell Observer mikroskopiert und anschließend die mittlere Intensität innerhalb der ganzen Zelle analysiert (Abbildung 13).

Nach der Stimulation der Rezeptortyrosinkinase mit dem spezifischen Liganden HGF, stieg die immuncytochemische Fluoreszenz leicht, aber signifikant auf 110% im Vergleich zur Kontrolle an.

Zusammenfassend ließ sich durch dieses Experiment zeigen, dass durch eine HGF Stimulation die Phosphorylierung von cMet in hippocampalen Neuronen induziert werden konnte.



C

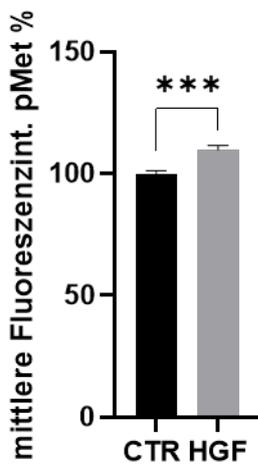


Abbildung 13: Effekt von HGF/ PHA Behandlung auf cMet Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen

A und **B** zeigen exemplarische Aufnahmen un behandelter und HGF stimulierter Zellen. Färbung: MAP2 (grün), P-cMet (rot) Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. In **A'** und **B'** wird das isolierte Signal von MAP2 und P-cMet dargestellt. Für die Quantifizierung wurden IMARIS Maskierungen für MAP2 und P-cMet generiert (**A''**, **B''**). **C**: Statistische Auswertung: t-Test + Mann Whitney Test, P-Wert<0.0001=***; CTR n=46, HGF n=45 ; Fehlerbalken=SEM.

10.1.8 HGF STIMULATION *IN VITRO* BEWIRKT EINE GESTEIGERTE GEPHYRINCLUSTERUNG, WÄHREND PHA ZU EINER REDUKTION DER GEPHYRINCLUSTERUNG FÜHRT

In einem auf 10.1.7 aufbauenden Experiment wurde untersucht, ob durch den Liganden HGF die Translokation von Gephyrin an die Membranoberfläche beeinflusst werden kann. Bisher konnte gezeigt werden, dass cMet für die Clusterung von Gephyrin notwendig ist. Ob die RTK auch hinreichend für das Clustern ist, soll über die Stimulation und Inhibition von cMet *in vitro* überprüft werden.

Die Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie im vorangegangenen Experiment behandelt, an DIV9 behandelt, für 24h behandelt und an DIV10 fixiert und nach Gephyrin immunocytochemisch gefärbt. Neben einer unbehandelt oder DMSO inkubierten Kontrolle wurden die Zellen mit HGF (50ng/ml) oder PHA-66572 (1 μ M) behandelt. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen für 2h mit PHA-66572 präinkubiert und anschließend mit HGF behandelt.

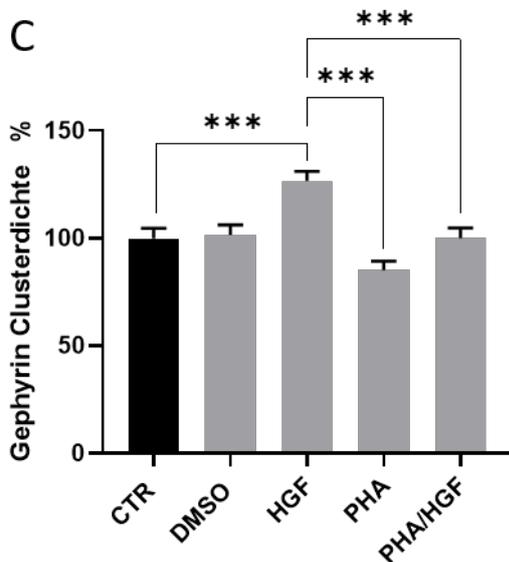
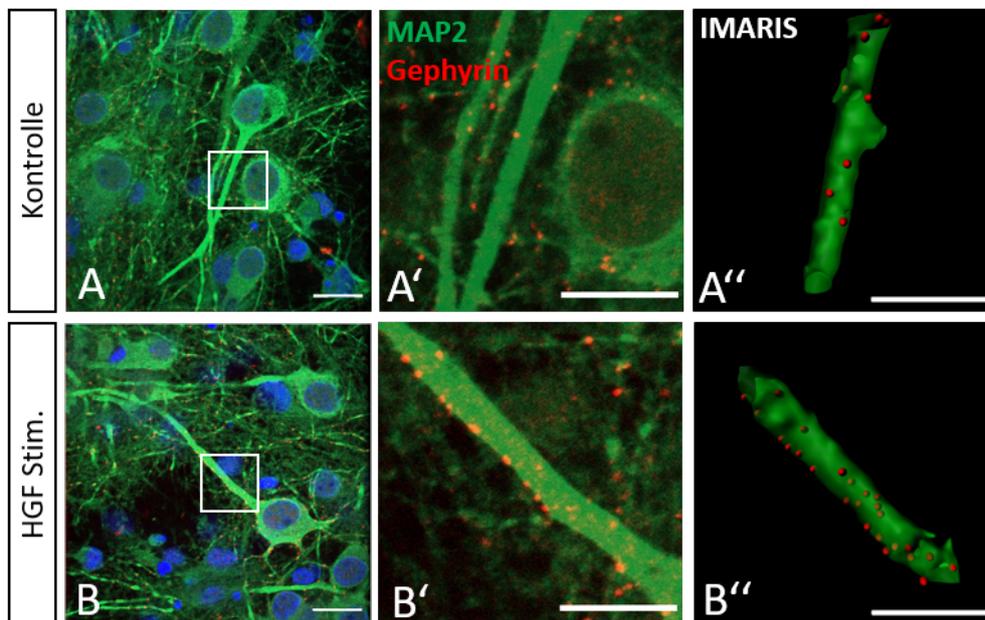


Abbildung 14: Effekt einer 24h HGF, PHA-66572 und PHA-66572/HGF Stimulation hippocampaler Neurone auf Gephyrin *in vitro*

A und **B** zeigen Originalaufnahme der hippocampalen Neurone DIV10. Kontrollzellen (**A**) wurden mit HGF stimulierten Zellen (**B**) verglichen. Färbungen: MAP2 (grün), Gephyrin (rot), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Neben den mikroskopischen Aufnahmen in **A** und **B** ist eine Vergrößerung des analysierten proximalen Dendrits mit den Färbungen MAP2 und Gephyrin zu sehen (**A'**, **B'**). Eine exemplarische IMARIS Bitplane Darstellung zeigt 25µm des maskierten proximalen Dendriten und die ebenfalls maskierten punktförmigen Gephyrin Strukturen (**A''**, **B''**). Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **C**: One-way ANOVA + Tukey's multiple comparison Test, $F(4, 364)=0.7245$, P-Wert < 0.001 =***; CTR n=75, HGF n=71, DMSO n=78, PHA n=73, PHA/HGF n=72; Fehlerbalken = SEM.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Cell Observer aufgenommen und im Anschluss mit der IMARIS Bitplane Software analysiert. Auf einem 25µm langen proximalen Dendrit wurde die Anzahl der Gephyrincluster ermittelt (Abbildung 14 A,B). Die statistische Analyse der Daten zeigte eine signifikante Hochregulation der Gephyrinclusterung nach HGF Stimulation auf 126% (Abbildung 14C). Durch die Behandlung mit dem cMet Antagonisten PHA-665752 konnte eine Reduktion der Gephyrinclusterung auf 85% erzielt werden. In dem präinkubierten Ansatz konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Im Vergleich mit dem HGF stimulierten Ansatz zeigten sowohl die PHA-66572 behandelten als auch die präinkubierten Zellen eine signifikante Reduktion der Gephyrinclusterung.

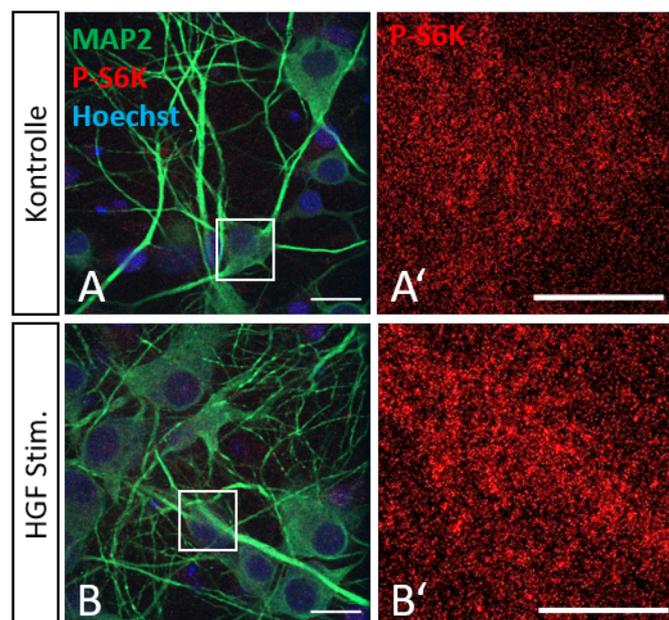
Zusammenfassend ist die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase cMet mit dem spezifischen Liganden HGF hinreichend, um die Gephyrinclusterung zu induzieren. Grundsätzlich ist das Clustern von Gephyrin von der Aktivierung der cMet Kinaseaktivität abhängig.

10.1.9 DIE HGF INDUZIERTE GEPHYRINCLUSTERUNG IST MTOR- UND ZEIT-ABHÄNGIG

In den Experimenten 10.1.7 und 10.1.8 konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor cMet sowohl induziert werden kann als auch die Rezeptortyrosinkinaseaktivität die Gephyrinclusterung an der Membranoberfläche beeinflusst. Um zu untersuchen, ob diese induzierte Translokation von mTOR abhängig ist, wurde die S6 Kinase Phosphorylierung untersucht. Eine gesteigerte Phosphorylierung der S6 Kinase wird eingeleitet durch eine erhöhte mTOR Aktivierung. Zu diesem Zweck wurden kontrollbeziehungsweise DMSO-behandelten Zellen analysiert. Die Kontroll-Zellen wurden verglichen mit einem HGF stimulierten, einem PHA-66572 präinkubierten und anschließend mit HGF stimuliertem Ansatz sowie einem reinen PHA-66572 Ansatz. Die Zellen wurden nach einer 30-minütigen Inkubation fixiert. In einem weiteren Ansatz wurden die verschiedenen Behandlungen für 24h auf den Zellen belassen und anschließend fixiert.

Wie bereits zuvor wurde die mittlere Intensität der P-S6K Färbung ermittelt. Im Vorfeld der vergleichenden Analyse wurde statistisch sichergestellt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und DMSO behandelten Zellen gab. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem Liganden HGF zeigten die Zellen eine Hochregulation der Phosphorylierung auf 108% (Abbildung 15). Die S6 Kinase Phosphorylierung der HGF behandelten Zellen unterschied sich allerdings signifikant von den Zellen, die mit PHA-66572 vorbehandelt und alleine mit PHA-66572 behandelt wurden.

Zusammenfassend zeigten die HGF stimulierten Zellen in einem 30-minütigen experimentellen Ansatz eine signifikante Erhöhung der S6 Kinase Phosphorylierung im Vergleich zu hippocampalen Neurone, die zusätzlich mit dem Inhibitor PHA-66572 behandelt wurden. Die mTOR Aktivierung ist somit abhängig von der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase cMet.



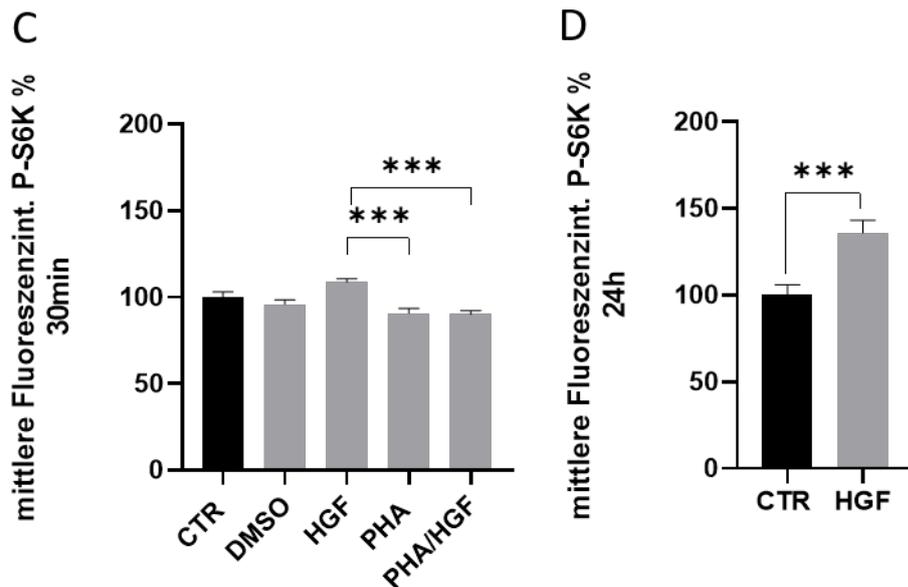


Abbildung 15: Effekt von HGF, PHA-66572 und PHA-66572/HGF Stimulation hippocampaler Neurone auf S6 Kinase Phosphorylierung *in vitro*

A zeigt Kontrollzellen, welche unbehandelt fixiert wurden. In **B** sind HGF stimulierte hippocampale Zellen exemplarisch dargestellt. Färbung: MAP2 (grün), PS6K (rot), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. In **A'** und **B'** ist die vergrößerte Darstellung des isolierten P-S6K Signals im analysierten Soma zu sehen. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **C**: 30min Behandlung; One-way ANOVA + Tukey's Test, $F(4, 363)=3.369$, P-Wert < 0.0001 =***; CTR n=57, HGF n=83, DMSO n=83, PHA n=68, PHA/HGF n=77. **D**: 24h Behandlung; t-Test, P-Wert < 0.001 =***; CTR n=30, HGF n=29. Fehlerbalken = SEM.

In dem 24h Ansatz konnte ein stärkerer Effekt der HGF Stimulation auf die S6 Kinase Phosphorylierung quantifiziert werden (Abbildung 15D). HGF stimulierte Zellen zeigten eine hochsignifikante Deregulation der mittleren Fluoreszenz auf 136%. Das verstärkte Clustern von Gephyrin korreliert folglich mit der Aktivierung von mTOR.

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen sowohl mit HGF stimuliert, als auch mit 200nm Rapamycin behandelt und mit Kontroll- behandelten Zellen verglichen (Abbildung 16). Die Auswertungsroutine wurde wie in 10.1.8 auf dem proximalen Dendrit durchgeführt.

In der Analyse konnte die Hochregulation der Gephyrinclustering nach HGF-Stimulation auf 123% bestätigt werden. Durch die Behandlung der hippocampalen Neurone mit 200nm Rapamycin konnte eine signifikante Reduktion der Gephyrinclustering auf 71% im Vergleich zu kontroll- behandelten Zellen erzielt werden. Eine zusätzliche Stimulation mit dem cMet Liganden HGF zeigte ähnlich wie die Behandlung mit dem Inhibitor alleine eine signifikante Runterregulation im Clusterverhalten des Gerüstproteins auf 76%.

Beide Experimente bestätigten, dass durch HGF Stimulation sowie PHA-665752 Behandlung die mTOR Aktivität beeinflusst werden konnte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation und Inhibition der Rezeptortyrosinkinase die Gephyrinclustering beeinflusst. Die Inhibition von mTOR konnte nicht durch eine Stimulation von cMet kompensiert werden. Somit ist die cMet induzierte Gephyrinclustering mTOR-abhängig.

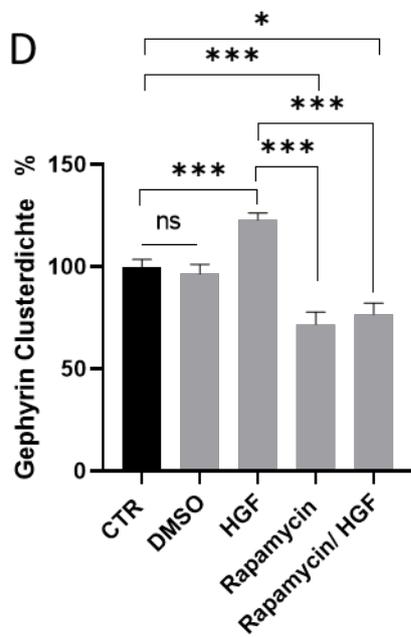
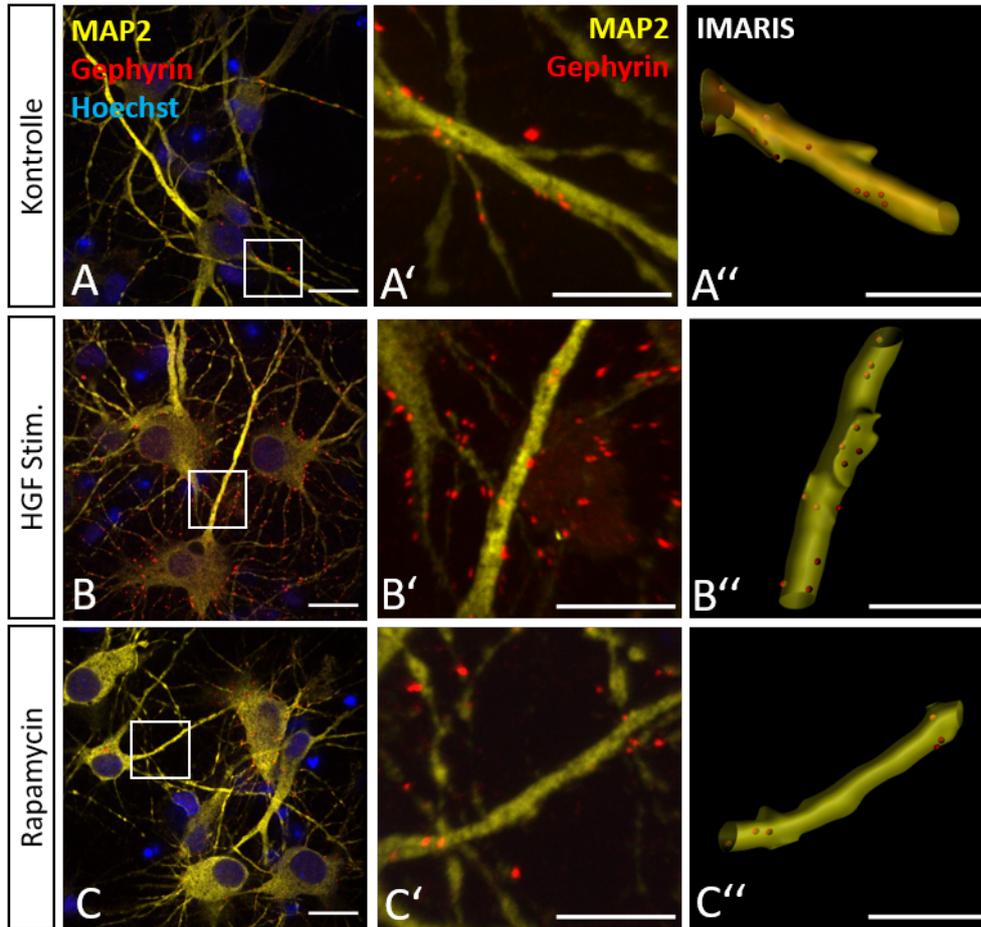


Abbildung 16: Effekt von HGF und Rapamycin auf Gephyrinclusterung in hippocampalen Neuronen
A-C zeigen exemplarische Aufnahmen von CTR (**A**) Zellen und HGF (**B**) sowie Rapamycin (**C**) behandelten Zellen. Färbung: Map2 (gelb), Gephyrin (rot), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. In einer Vergrößerung ist der analysierte proximale Dendrit zu sehen (**A'-C'**). Eine beispielhafte Darstellung der MAP2 und Gephyrin Maskierung ist in **A''-C''** dargestellt. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **F**: ANOVA + Kruskal-Wallis Test, $H(4)=69.32$, $P\text{-Wert}=0,0203=*$, $P\text{-Wert}< 0,0001=***$; CTR $n=120$, HGF $n=111$, DMSO $n=43$, Rapamycin $n=45$, Rapamycin/ HGF $n=43$; Fehlerbalken = SEM.

10.2 TSC2 beeinflusst die Gephyrinclusterung

Die Rezeptortyrosinkinase cMet reguliert mTOR- abhängig die Clusterung des inhibitorischen Gerüstproteins Gephyrin. TSC2 ist ein Regulatorprotein von mTOR und hat Einfluss auf dessen Aktivitätszustand. Daraus ergibt sich die Frage, ob TSC2 ebenfalls an der Regulation der Gephyrinclusterung beteiligt ist.

Ziel des experimentellen Aufbaus war es, den TSC2 Komplex in Bezug auf seine regulatorische Wirkung auf mTOR zu charakterisieren und damit einen weiteren möglichen Mechanismus der Gephyrinclusterung zu identifizieren. Hierfür wurden spezifische, lentivirale Knockdown Viren für den TSC2 Komplex eingesetzt.

10.2.1 REDUKTION VON TSC2 NACH KNOCK-DOWN AUF PROTEINEBENE *IN VITRO*

Um zu untersuchen, ob TSC2 einen Einfluss auf inhibitorische oder exzitatorische synaptische Strukturen hat, wurden zwei unabhängige, lentivirale Knockdown Konstrukte eingesetzt um „Off-target-Effekt“ auszuschließen. Wie bereits für die cMet Knockdown Konstrukte in 10.1.2 beschrieben, wurden lentivirale Konstrukte generiert, welche eine miRNA enthalten, die mit endogener mRNA interferiert. Bereits im Vorfeld wurde durch die Arbeitsgruppe die Funktionalität der Konstrukte durch eine TaqMAN Analyse validiert. Corticale Zellen wurden an DIV3 mit lentiviralen Suspensionen transduziert und für weitere 12 Tage kultiviert. Für das mi500 Konstrukt wurde eine Reduktion der mRNA Expression auf 59% und für mi2675 auf 48% gemessen.

Um das Ergebnis auch auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden hippocampale Zellen an DIV3 mit den lentiviralen Konstrukten infiziert. Nach dem Fixieren der Zellen an DIV10 wurden die Zellen immunocytochemische nach TSC2 gefärbt. Im Anschluss wurde in den mikroskopischen Aufnahmen die mittlere Intensität der Immunfluoreszenz von TSC2 bestimmt. Dazu wurde eine „Region of Interest“ um das Soma des Neurons gelegt und das darin enthaltene Signal quantifiziert.

In Abbildung 17 ist eine exemplarische, mikroskopische Aufnahme von miCTR und mi2675 transduzierten Zellen zu sehen. Im Bereich des Somas konnte eine deutliche Minderung des Fluoreszenzsignals quantifiziert werden. Die statistische Analyse bestätigten, dass im Vergleich zur Kontrolle durch beide lentiviralen Knockdown Konstrukte eine signifikante Reduktion der mittleren TSC2 Intensität induziert wurde. Während durch das mi500 Konstrukt eine signifikante Reduktion auf 88% gemessen wurde, zeigte sich bei mi2675 eine Reduktion auf 80%.

Sowohl das Konstrukt mi500 als auch mi2675 zeigten eine Reduktion des immuncytochemischen Fluoreszenzsignals für den TSC2 Komplex *in vitro* und bestätigen somit einen Knockdown auf Proteinebene.

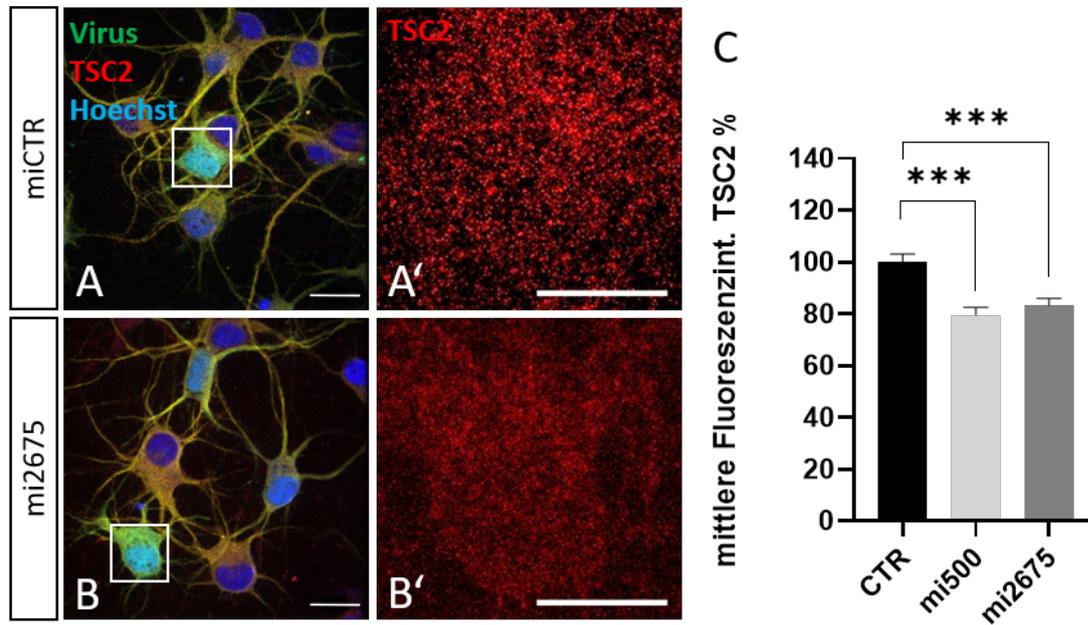


Abbildung 17: Immuncytochemische Quantifizierung des TSC2 Signals nach Knockdown in vitro

A und **B** zeigen Exemplarische, viral transduzierte Zellen (miCTR, mi2675). Färbung: TSC2 (rot), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Viral transduzierte Zellen werden durch eine grüne Fluoreszenz kenntlich gemacht. Die Vergrößerung stellt die isolierte Fluoreszenz von TSC2 (rot) im Soma (**A'**, **B'**) dar. Viral transduzierte Zellen sind in grün gefärbt, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **C**: Statistische Analyse der mittleren Intensität von TSC2. One-way ANOVA + Tukey's Test, $F(2, 197)=0.2774$, P-Wert < 0.0001; miCTR n=69, mi500=63, mi2675 n=68, Fehlerbalken=SEM.

10.2.2 KNOCK-DOWN VON TSC2 BEWIRKT EINE GESTEIGERTE GEPHYRINCLUSTERUNG *IN VITRO*

Im vorangegangenen Experiment konnte die Funktionalität der lentiviralen Knockdown Konstrukte durch eine Quantifizierung der TSC2 Immunfluoreszenz *in vitro* verifiziert werden. Im Folgenden wird der Einfluss des TSC2 Knockdowns auf synaptische Marker untersucht.

Um einen Effekt von TSC2 auf die Regulation synaptischer Strukturen *in vitro* zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone an DIV3 mit den bereits getesteten, viralen Konstrukten transduziert. An DIV10 wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und immunocytochemisch gefärbt. Mit Hilfe von IMARIS wurden die verschiedenen exzitatorischen (PSD95 und VGluT) und inhibitorischen Marker (Gephyrin und VGAT) in einem 25µm Abschnitt eines proximalen Dendrits quantifiziert.

Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Erhöhung der Gephyrinclusterdichte nach lentiviralem Knockdown im Vergleich mit CTR transduzierten Zellen. Beide miRNAs wiesen eine signifikante verstärkte Clusterdichte von 130% auf. Der präsynaptische Marker VGAT hingegen zeigte keine signifikante Veränderung, lediglich eine leichte Tendenz einer Hochregulation für mi2675 auf 108%.

Für die exzitatorischen Marker VGluT und PSD95 konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu CTR transduzierten Zellen ermittelt werden.

Beide unabhängigen Knockdown Konstrukte des TSC2 Proteins zeigten einen signifikanten Effekt auf das postsynaptische Gerüstprotein Gephyrin. Bei der Analyse exzitatorischer Marker konnte keine signifikante Veränderung durch das reduzierte TSC2 Level ermittelt werden. Grundsätzlich ist der detektierte Effekt spezifisch für Gephyrin und unterstützt die Aussage, dass die Aktivierung von mTOR für das Clustern von Gephyrin hinreichend ist.

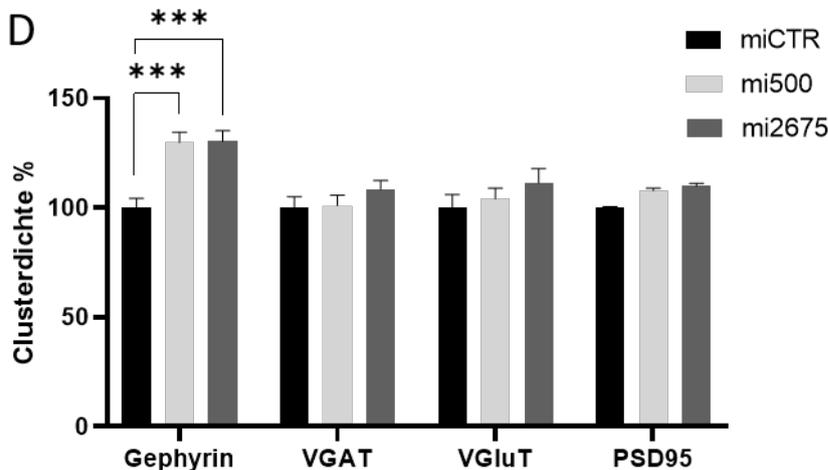
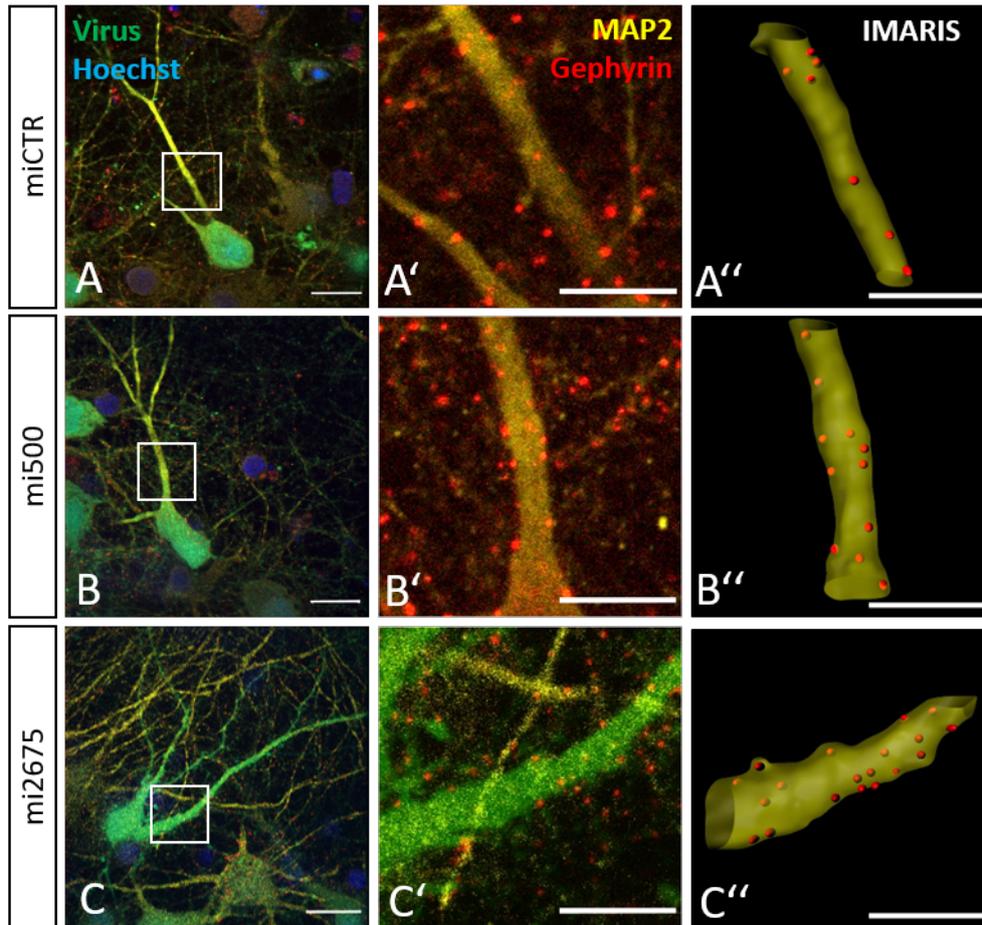


Abbildung 18: Immunocytochemische Quantifizierung der synaptischen Marker nach TSC2 Knockdown *in vitro*

A-C sind exemplarische, viral transduzierte, hippocampale Zellen (miCTR (**A**), mi500 (**B**), mi2675(**C**)) zu entnehmen. Färbung: MAP2 (Cy5), Gephyrin (Cy3), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Neben den mikroskopischen Aufnahmen ist eine Vergrößerung des analysierten proximalen Dendrits mit den Färbungen MAP2 und Gephyrin zu sehen (**A'-C'**). In **A''-C''** ist eine exemplarische IMARIS Bitplane MAP2 und Gephyrin Maskierung für 25µm des jeweiligen proximalen Dendrits dargestellt. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **D**: Statistische Analyse der synaptischen Cluster. 2-way ANOVA + Tukey's Test, $F(2, 657) = 9,780$, P-Wert $< 0.0001 = ***$; Gephyrin: miCTR n=114, mi500 n=75, mi2675 n=75, VGAT: miCTR n=45, mi500 n=44, mi2675 n=44, PSD95: miCTR n=45, mi500 n=46, mi2675 n=45, VGlut: miCTR n=46, mi500 n=45, mi2675 n=45. Für die Analyse der synaptischen Marker VGAT, PSD95 und VGlut konnte keine signifikante Veränderung gemessen werden; Fehlerbalken=SEM.

10.2.3 REDUKTION VON TSC2 AUF PROTEINEBENE NACH KNOCK-DOWN *IN VIVO*

Nachdem *in vitro* ein Effekt des TSC2 Knockdowns auf die Dichte der Gephyrincluster nachgewiesen werden konnte, wurde das lentivirale Konstrukt *in vivo* untersucht. Der experimentelle Ablauf wurde bereits in 10.1.5 beschrieben.

Die TSC2 Knockdown Konstrukte wurden mittels stereotaktischer Injektion in den Gyrus Dentatus von 3 Monate alten Ratten injiziert. Die Daten von drei injizierten Tieren einer Injektions-Gruppe wurden jeweils gepoolt. Eine Einzelanalyse der Tiere wurde ebenfalls durchgeführt (siehe Abbildung 29).

Zu Beginn wurde die Expression des TSC2 Proteins über Immunfluoreszenz überprüft, um die Funktionalität der Konstrukte *in vivo* zu bestätigen. Durch die Analyse der Daten konnte eine Reduktion der TSC2 Clusterdichte detektiert werden. Im Gegensatz zu den *in vitro* Daten, wurden die *in vivo* Analysen auf 25µm des proximalen Dendriten durchgeführt. Diese geänderte Auswertungsroutine lässt sich begründen durch die abweichenden Fluoreszenzsignale des TSC2 Proteins *in vivo*. Im Vergleich zu den diffusen Signalen *in vitro* zeigten sich *in vivo* deutliche punktuelle Strukturen.

Analysiert wurden lentiviral, transduzierte Zellen aus dem Stratum granulosum des Gyrus Dentatus. Durch beide Konstrukte konnte eine signifikante Inhibition der TSC2 Expression auf proximalen Dendriten gemessen werden. Das mi500 Konstrukt zeigt eine Reduktion auf 55%, während das mi2675 Konstrukt eine Reduktion auf 63% im Vergleich zu kontroll- infizierten Zellen aufwies. Beide viralen Konstrukte zeigten einen funktionellen Effekt auf den TSC2 Proteingehalt *in vivo*.

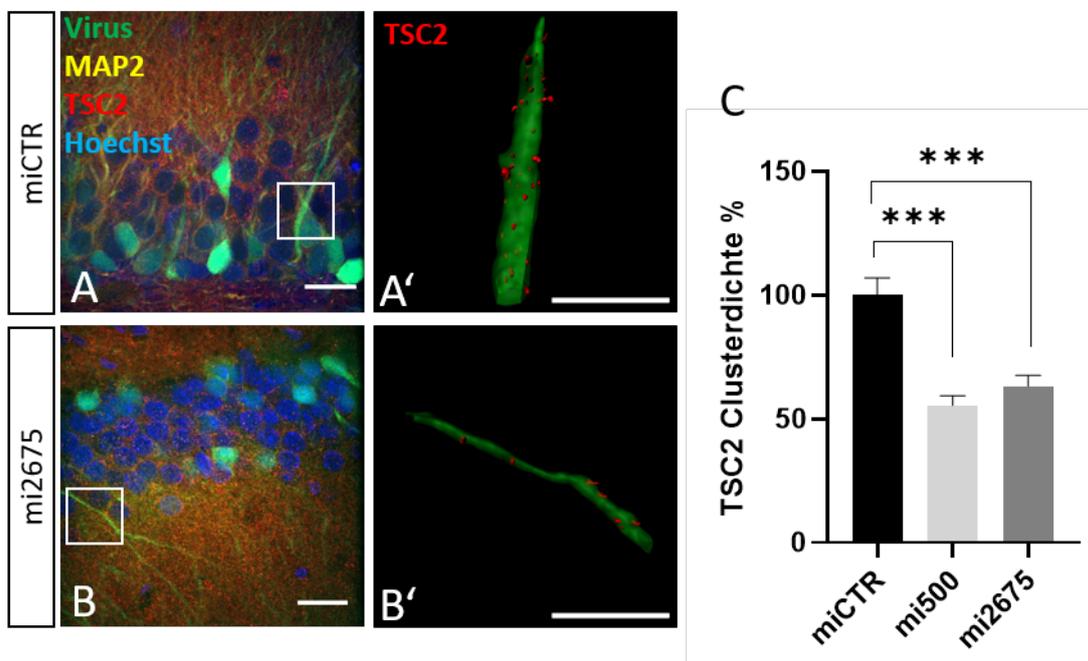


Abbildung 19: Immunocytochemische Quantifizierung des TSC2 Signals nach Knockdown *in vivo*

In **A** und **B** ist eine exemplarische, viral (miCTR, mi2675) transduzierte Zellen aus dem GD der Ratte. Färbung: MAP2 (Cy5), TSC2 (Cy3), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Der weiße Rahmen in **A** und **B** zeigt den analysierten proximalen Dendriten. In einer Vergrößerung ist das IMARIS maskierte MAP2 und TSC2 Signal visualisiert (**A'**, **B'**). **A''** und **B''** zeigen die generierte IMARIS Maskierung des proximalen Dendrits. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm. **C**: Statistische Analyse der mittleren Intensität von cMet. ANOVA + Kruskal-Wallis-Test, $H(2)=28.57$, $P\text{-Wert} < 0.0001 = ***$; miCTR n=66, mi500 n=70, mi2675 n=63; Fehlerbalken=SEM.

10.2.4 KNOCK-DOWN VON TSC2 IM GYRUS DENTATUS BEWIRKT EINE REDUKTION SYNAPTISCHER MARKER *IN VIVO*

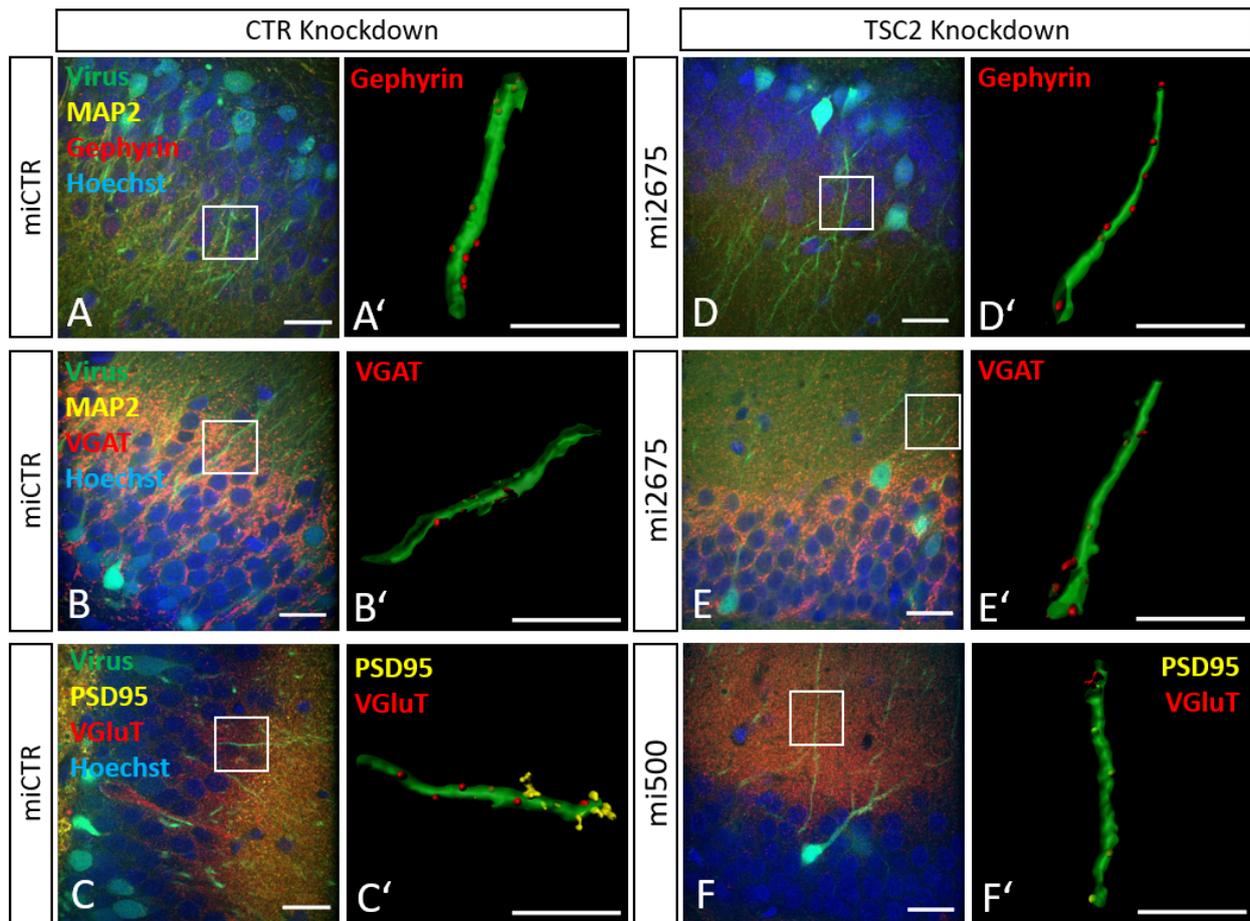
In gleicher Weise zum cMet Knockdown *in vivo*, wurde bei der Analyse des TSC2 Knockdowns vorgegangen. Zur Quantifizierung, ob das intrazelluläre TSC2 Protein einen regulatorischen Effekt auf synaptische Strukturen hat, wurden prä- und postsynaptische Marker gefärbt. Exemplarisch für inhibitorische Synapsen wurde präsynaptisch GAD65 (Glutamat Decarboxylase 65) und postsynaptisch Gephyrin analysiert. Um die Anzahl exzitatorischer Synapsen zu quantifizieren, wurde präsynaptisch nach VGLuT und postsynaptisch nach PSD95 gefärbt.

Alle *in vivo* Analysen des Knockdown Experiments wurden im Stratum granulosum des Gyrus Dentatus durchgeführt. Es wurden lentiviral transduzierte Zellen analysiert, die eine deutliche EGFP-Fluoreszenz aufwiesen. Auf einem 25µm Abschnitt eines proximalen Dendrits wurde die Clusterdichte der verschiedenen Marker mittels IMARIS quantifiziert. Die genaue Durchführung der Analyse wurde bereits unter 10.1.3 beschrieben.

Durch den Knockdown von TSC2 wurde eine signifikante Reduktion der Gephyrinclusterung auf 35% mit dem mi500 und auf 53% mit dem mi2675 Konstrukt erzielt (Abbildung 20). Weiterhin wurde die Clusterdichte des präsynaptischen Markers GAD65 auf 69% reduziert. Für das mi500 Konstrukt konnte kein signifikanter Effekt detektiert werden, allerdings eine Tendenz einer verminderten Clusterdichte (P-Wert=0,1144).

Für die exzitatorischen Marker konnte für das mi500 Konstrukt eine Reduktion der Clusterdichte des postsynaptischen Gerüstproteins PSD95 auf 70% detektiert werden. Für den präsynaptischen VGLuT Marker zeigten beide injizierten Konstrukte eine Reduktion. Während das mi500 Konstrukt eine Reduktion auf 62% des VGLuT Signals erzielte, sank die Clusterdichte durch mi2675 auf 57% im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt.

Grundsätzlich konnte durch die Injektion der Knockdown Konstrukte in den Gyrus Dentatus gezeigt werden, dass eine Reduktion der TSC2 Expression einen Effekt auf inhibitorische sowie exzitatorische, synaptische Proteine im adulten Gehirn hat.



G

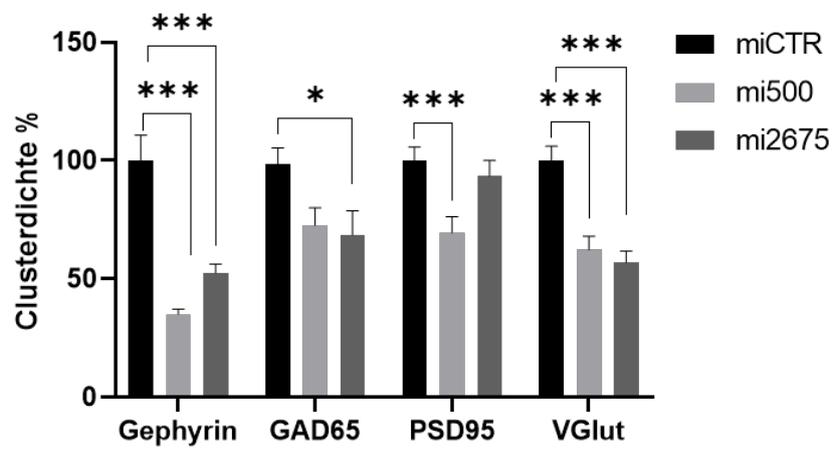


Abbildung 20: TSC2 knockdown im Gyrus Dentatus der Ratte verursacht eine Reduktion synaptischer Markerproteine

A-C: Histologischer Schnitt aus dem GD der CTR transduzierten Ratte. Färbung: Gephyrin(rot), VGAT (rot), VGlut (gelb) und PSD95 (rot), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Neben einer Originalaufnahme in **A-C** werden exemplarische IMARIS Bitplane Maskierungen auf 25µm eines proximalen Dendrits gezeigt (**A'-C'**). **D-F:** Gleiche Färbungen für exemplarische TSC2KD transduzierte histologische Schnitte. In **D'-F'** ist die exemplarische IMARIS Maskierung gezeigt. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **G:** Zeigt die IMARIS basierte Auswertung der inhibitorischen und exzitatorischen synaptischen Marker. 2-Way ANOVA + Tuckey's Test, $F(2, 718) = 41,95$, $P\text{-Wert} = 0,0352 = *$, $P\text{-Wert} < 0,0001 = ***$; Gephyrin: (miCTR n=63, mi500 n=77, mi2675 n=80) $P\text{-Wert} < 0,0001 = ***$, GAD65: (miCTR n=61; mi500 n=27; mi2675 n=25), PSD95 (miCTR n=87; mi500 n=61; mi2675 n=57), VGlut (miCTR n=85; mi500 n=52; mi2675 n=55); Fehlerbalken=SEM.

10.2.5 KNOCKDOWN VON TSC2 IM GYRUS DENTATUS INHIBIERT DIE PHOSPHORYLIERUNG DER P70 S6 KINASE

Da die Gephyrinclusterung einhergeht mit der Aktivierung von mTOR, was wiederum durch den TSC2 Komplex reguliert wird, liegt es nah bei einer Reduktion der Gephyrinclusterung, verursacht durch den Knockdown von TSC2, auch das Phosphorylierungslevel der S6 Kinase zu untersuchen. Das Phosphorylierungslevel der S6 Kinase dient dabei als Marker für die Aktivierung von mTOR.

Wie in 10.1.9 bereits beschrieben, wurde das Soma infizierter Zellen im Stratum Granulosum des Gyrus Dentatus analysiert. Die 50µm dicken Schnitte wurden gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität der phosphorylierten S6 Kinase für beide TSC2 Knockdown Konstrukte analysiert. Die statistische Auswertung zeigt eine schwache, aber dennoch signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignals auf 93% im Vergleich zu quantifizierten Kontrollzellen (Abbildung 21).

Grundsätzlich zeigt der TSC2 Knockdown *in vitro* eine verstärkte Gephyrinclusterung. Eine verminderte TSC2 Expression *in vivo* wiederum resultierte in einer reduzierten Gephyrinclusterung, die mit einer ebenfalls reduzierten S6 Kinase Phosphorylierung einhergeht. Die Reduktion des Gerüstproteins Gephyrin korreliert mit einem Verlust präsynaptischer, GABAerger Terminale.

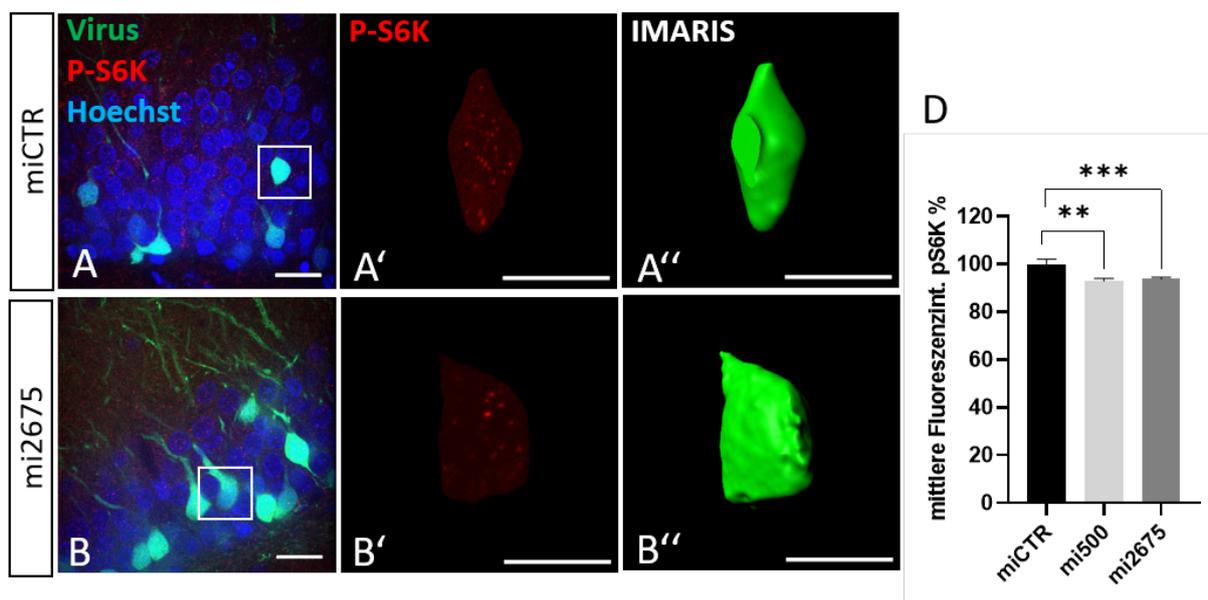


Abbildung 21: TSC2 Knockdown *in vivo* reduziert die Phosphorylierung der S6 Kinase

A und **B** zeigen Originalaufnahmen von miCTR (**A**) und mi2675 (**B**) injizierten histologischen Schnitte. Färbung: P-S6K (rot), viral transduzierte Zellen in grün, Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. **A'+B'**: Vergrößerte Darstellung der analysierten P-S6k Fluoreszenz im Soma. **A''+B''**: IMARIS-Maskierung des analysierten transduzierten Somas. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **C**: Statistische Analyse der S6 Kinase Phosphorylierung; Ordinary one-way ANOVA + Dunns multiple comparison Test, $F(2, 225)=6.392$, $P\text{-Wert}<0.0001=***$; $P\text{-Wert}=0.0011=**$; miCTR n=59, mi500 n=72, mi2675 n=97; Fehlerbalken=SEM.

10.3 Die Überexpression des endosomalen Markers Rab5A führt zu einer Reduktion von inhibitorischen Synapsen

Das Ras-related Protein Rab5A, oder kurz Rab5A, ist einer der meist erforschten Marker des frühen Endosoms und als Hauptregulator der Endosomen-Konversion bekannt [70]. Aktiviert wird das Protein durch den Guanin Nukleotid Exchange Factor (GEFs) Rabex-5, der mit Hilfe von Rabapentin-5 das Rab5A gebundene GDP zu GTP ändert [67]. Grundsätzlich ist Rab5A ein essenzieller Modulator der frühen Endosome und beteiligt an der Reifung zum späten Endosom/ Lysosom. In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Rab5A Varianten das mTORC1 Signaling beeinflussen beziehungsweise unterbinden kann. Überexpression von Rab5A führt zu einer Reduktion von Gephyrinclusterung *in vitro*.

10.3.1 ÜBEREXPRESSION VON RAB5A FÜHRT ZU EINER REDUKTION DER GEPHYRINCLUSTERDICHTE *IN VITRO*

Im folgenden Experiment wurde untersucht welchen Einfluss die Überexpression verschiedener Rab5A (konstitutiv aktiv=CA, dominant negativ=DN und Wildtyp=WT) Varianten auf die Clusterung von Gephyrin haben.

Hippocampale Neurone wurden an DIV8-9 mit CA (CMV_mCherry-Rab5CA(Q79L)), DN (CMV_mCherry-Rab5DN(S34N)) und WT (CMV_mRFP_Rab5) Plasmid-Varianten des Rab5A Proteins transfiziert. Die Rab5A Proteinvarianten wurden als Fusionsproteine mit mCherry exprimiert. Zur besseren Beurteilung der Transfektionseffizienz wurde stets ein grün fluoreszierendes Kontroll-Plasmid (pEGFP_N1, exprimiert EGFP unter einem CMV-Promotor) mitgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen an DIV10 fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und Gephyrin immunocytochemisch nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mit IMARIS Bitplane. Analysiert wurden 25µm des proximalen Dendrits. Normiert wurde die Auswertung der Rab5A Varianten auf eine Gruppe Kontrolle transfizierter Zellen (EGFP). Die Auswertung zeigte eine signifikante Reduktion der Gephyrinclusterung in Rab5CA und Rab5 DN transfizierten Zellen auf ca. 75%. Die Gruppe der WT überexprimierenden Neurone zeigte keinen Effekt auf die Gephyrinclusterung (Abbildung 22).

Die Auswertung zeigte eine signifikante Veränderung der Gephyrinclusterdichte in Rab5CA und Rab5 DN transfizierten Zellen auf ca. 75%. Die Gruppe der WT überexprimierenden Neurone zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Gephyrinclusterung (Abbildung 22).

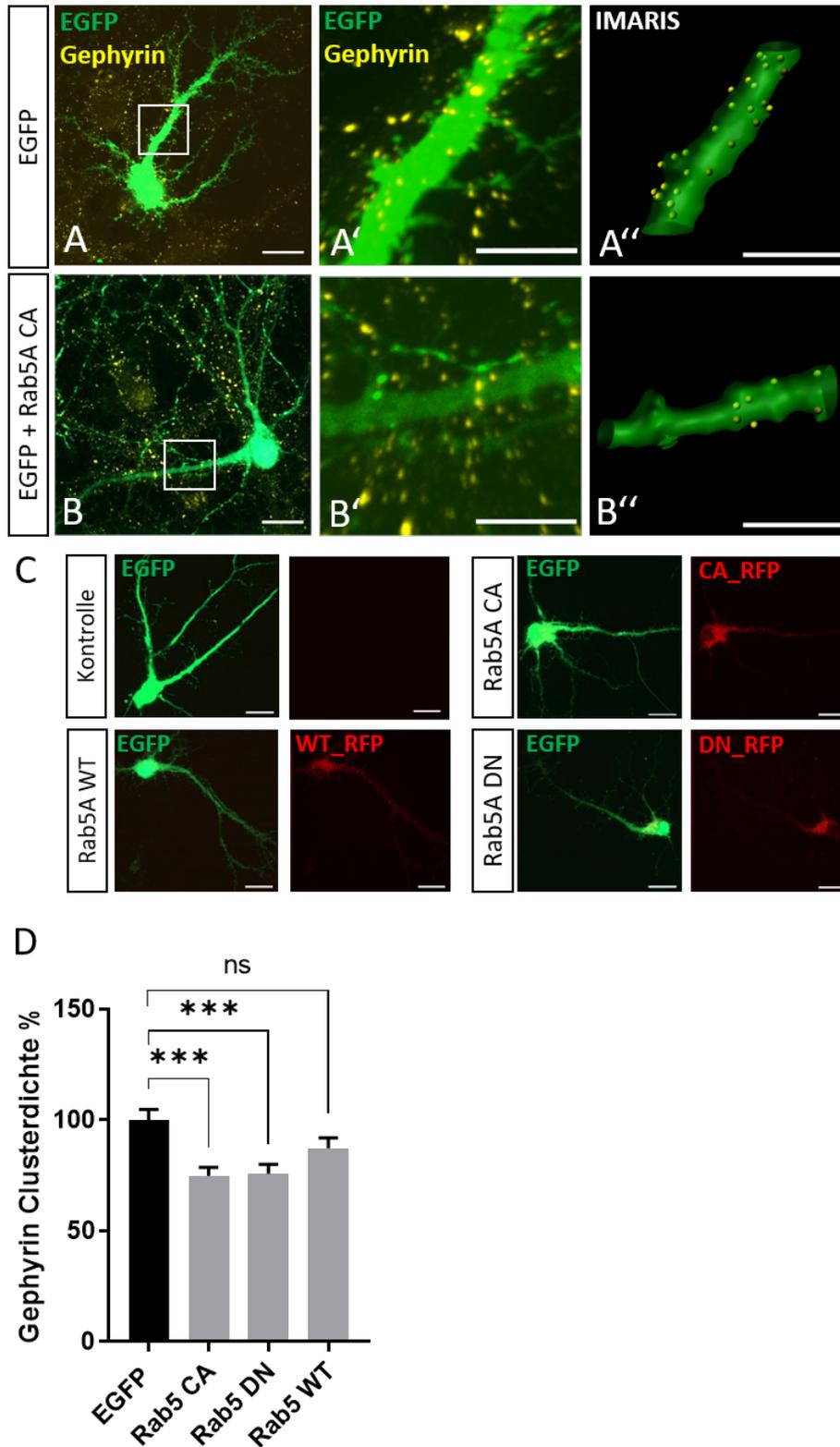


Abbildung 22: Effekt von Rab5 Varianten auf die Gephyrinclusterung in hippocampalen Neuronen
 In **A** ist eine Kontroll- transfizierte Zelle zu sehen. **B** zeigt eine mit Rab5A konsitutiv aktiv transfizierte Zelle. In **A'**, **B'** ist eine beispielhafte Vergrößerung eines proximalen Dendriten abgebildet und **A''**, **B''** zeigt die dazugehörige IMARIS Maskierung. Eine Beispiel-Aufnahme aller Transfektionsansätze (EGFP, Rab5 CA + EGFP, Rab5 DN + EGFP, Rab5 CA + EGFP) ist **C** zu entnehmen. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. **D**: Statistische Auswertung; ANOVA + Kruskal-Wallis-Test, $H(3)=19.11$, $P\text{-Wert}<0.0001=***$, $P\text{-Wert}=0.0073=**$; EGFP n=62, Rab5ACA n=63, Rab5ADN n=57, Rab5AWT n=58; Fehlerbalken=SEM.

10.3.2 ÜBEREXPRESSION VON RAB5A FÜHRT ZU EINER REDUKTION DER S6 KINASE PHOSPHORYLIERUNG *IN VITRO*

Im Folgenden wurde untersucht, ob der veränderten Gephyrinclusterung nach Rab5A CA Transfektion eine reduzierte mTOR Aktivität zu Grunde liegt. Wie bereits in Experiment 10.1.9 wurde für die Analyse die Aktivierung der S6 Kinase Phosphorylierung anhand der mittleren Fluoreszenzintensität quantifiziert.

Hippocampale Neurone wurden an DIV8 transfiziert. Da Rab5A CA den stärksten Effekt auf die Gephyrinclusterung zeigte, wurde für dieses Experiment lediglich ein Vergleich zwischen Kontroll- und Rab5A CA transfizierten Zellen quantifiziert. 1-2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Mit Hilfe der Zen Software wurde die mittlere Intensität der phosphorylierten S6 Kinase bestimmt (Abbildung 23). Die statistische Auswertung mit Graphpad zeigte eine hoch signifikante Verstärkung des phosphorylierten S6 Kinase Signals in transfizierten, hippocampalen Neuronen. Durch die Überexpression des Rab5A CA Proteins wurde eine Reduktion der mittleren Fluoreszenz auf 77% erzielt.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Rab5A CA die Aktivität von mTOR in hippocampalen Neuronen inhibiert.

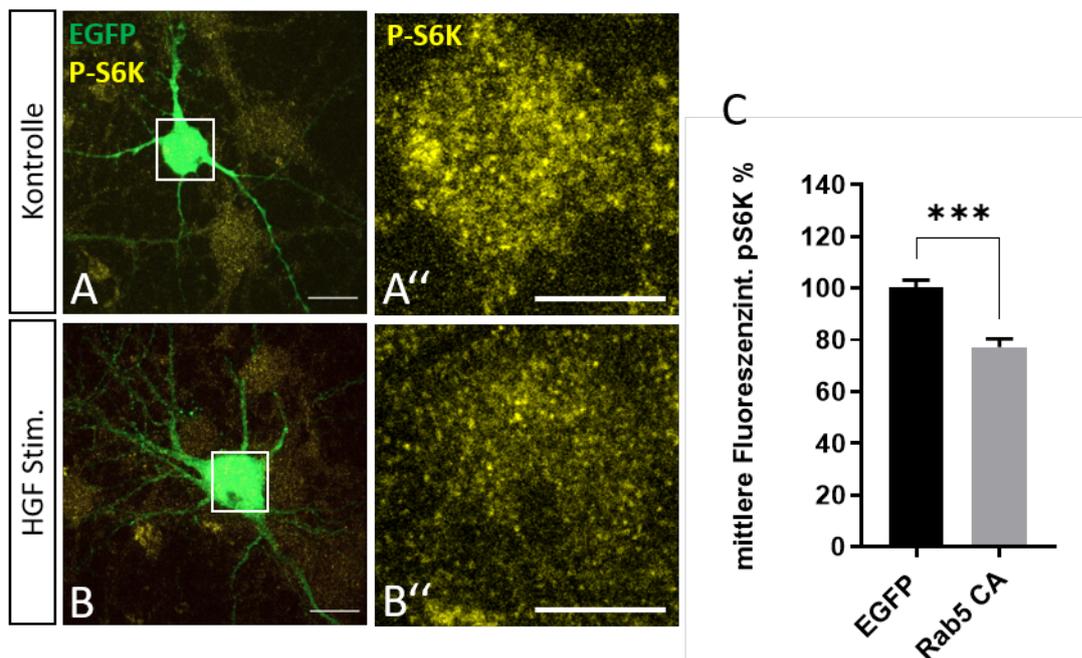
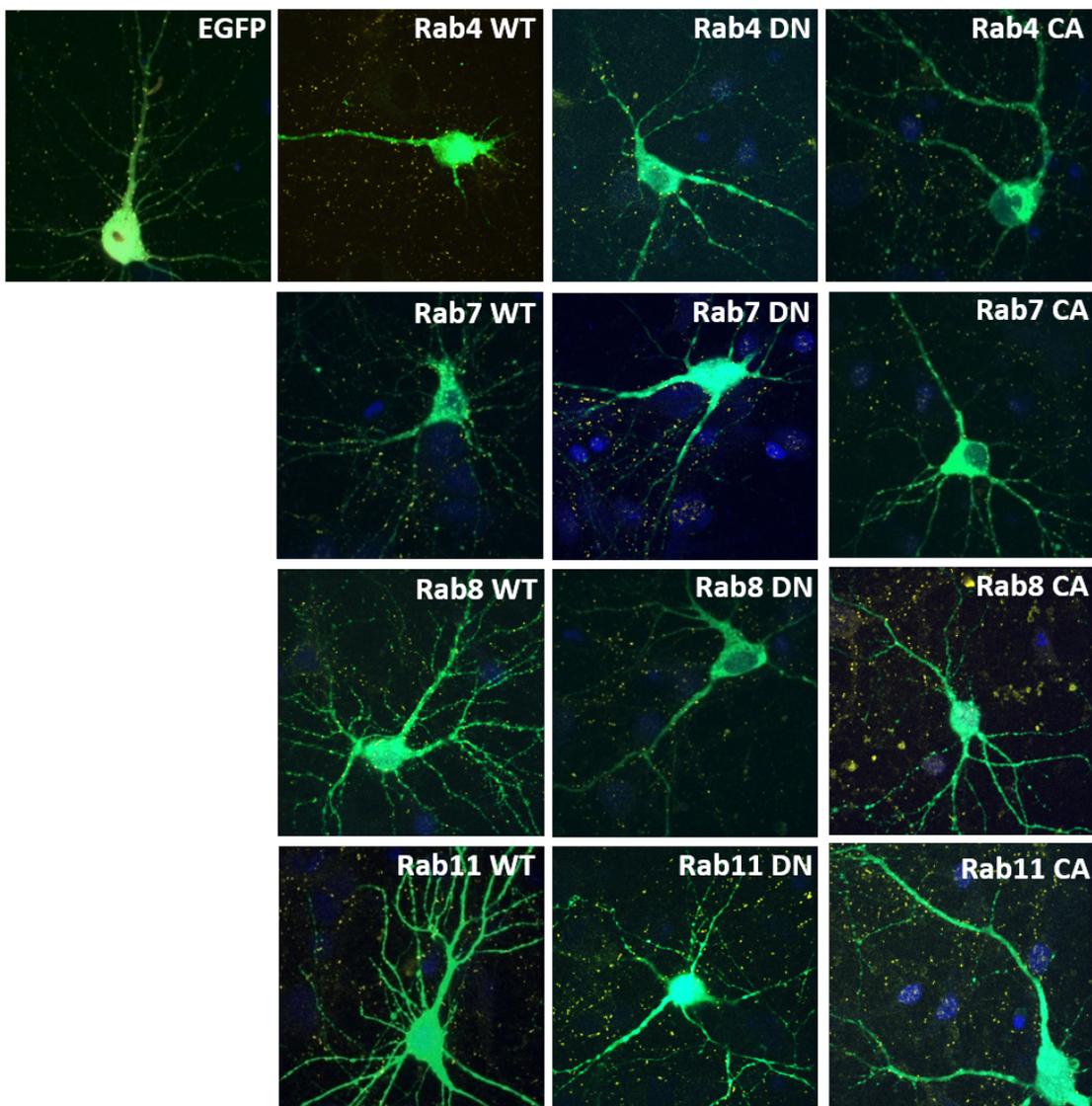


Abbildung 23: Effekt von RAB5A CA Überexpression auf S6 Kinase Phosphorylierung

Beispielhafte Aufnahmen einer Kontroll- transfizierten Zelle (A) und einer Rab5A CA transfizierten Zelle (B). In A' und B' ist die isolierte Fluoreszenz des P-S6K Fluoreszenzsignals zu sehen. Der Maßstabsbalken der Originalaufnahme entspricht 20µm, der Vergrößerung 10µm. C: t-Test; P-Wert<0.0001=***; EGFP n=39, EGFP + Rab5CA n=35; Fehlerbalken=SEM.

10.3.3 ÜBEREXPRESSION VON WEITEREN RAB PROTEINEN HAT KEINEN EFFEKT AUF DIE GEPHYRINCLUSTERUNG *IN VITRO*

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Rab5A CA Einfluss auf die mTOR Aktivität hat, was wiederum mit einer reduzierten Gephyrinclusterung korreliert. Um zu überprüfen, ob auch andere endosomale Rab Proteine die Gephyrinclusterung beeinflussen, wurden Wildtyp, konstitutiv aktive, und dominant negative Versionen der Rab Proteine 4, 7, 8 und 11 in hippocampale Neurone transfiziert. Die Rab Proteine waren entweder an eine rote Fluoreszenzmarkierung oder an einen HA-Tag gekoppelt. Ähnlich zu den Experimenten 10.3.1 und 9.3.2 wurde eine EGFP Fluoreszenz mitgeführt um die Transfektionseffizienz besser bewerten zu können.

A

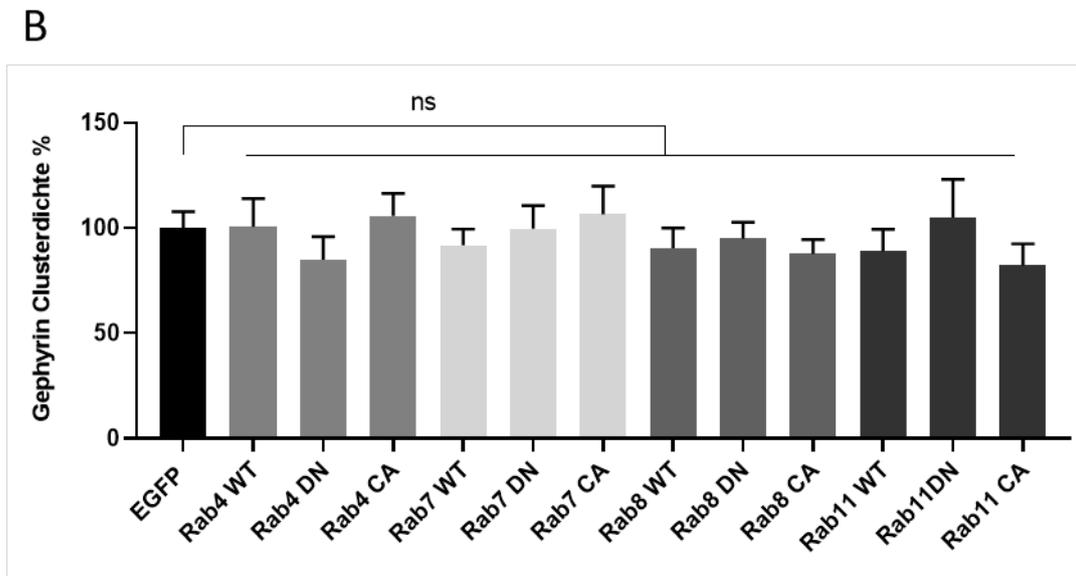


Abbildung 24: Effekt von Kontroll Rab Varianten auf die Gephyrinclusterung

In **A** sind exemplarische transfizierte hippocampale Zellen abgebildet. Folgende Plasmide wurden transfiziert: Wildtyp WT, dominant negativ DN, konstitutiv aktiv CA Rab Varianten (Rab4, Rab7, Rab8 und Rab11). Färbung: ein EGFP exprimierendes Plasmid färbt die ganze Zelle, Gephyrin (gelb), Hoechst-Färbung zur Darstellung der Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 20µm. **B**: Statistische Darstellung: ANOVA + Kruskal-Wallis-Test $H(12)=8.570$, ns= nicht signifikant; EGFP n=48, Rab4WT n=20, Rab4DN n=12, Rab4CA n=20, Rab7WT n=33, Rab7DN n=27, Rab7CA n=24, Rab8WT n=29, Rab8DN n=21, Rab8CA n=29, Rab11WT n=40, Rab11DN n=11, Rab11CA n=26, es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der EGFP Kontrolle gemessen werden. Fehlerbalken=SEM.

In der statistischen Auswertung der Gephyrinclusterung zeigt sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zu Kontroll- transfizierten Neuronen.

Die durch Rab5A induzierte endosomale Konversion vom frühen zum späten Endosom ist essentiell für die Translokation von Gephyrin an die Membranoberfläche hippocampaler Zellen. Durch die Transfektion mit einer konstitutiv aktiven Variante von Rab5A konnte eine Reduktion der mTOR Aktivität nachgewiesen werden. Es gibt keine Evidenzen für die Beteiligung anderer Rab Proteine an der Gephyrinclusterung.

11 DISKUSSION

Ziel der Doktorarbeit war es, den Einfluss der Rezeptortyrosinkinase cMet auf die Regulation und Stabilität GABAerger Synapsen zu untersuchen. Grundsätzlich ist die Rezeptortyrosinkinase cMet mit inhibitorischen und exzitatorischen postsynaptischen Gerüstproteinen kolokalisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass cMet notwendig für das Clustern des postsynaptischen Gerüstproteins Gephyrin ist. Durch die Stimulation mit HGF konnte bestätigt werden, dass cMet zudem hinreichend für die Clusterung von Gephyrin ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass mTOR-Signalwege an diesen Prozessen beteiligt sind und der mTOR Regulator TSC2 dabei eine wichtige Rolle spielt. Die Konversion vom frühen zum späten Endosom ist essentiell für die Aktivierung von mTOR und die Bildung der postsynaptischen Gephyrin-Gerüststruktur.

11.1.1 CMET ALS REGULATOR SYNAPTISCHER PLASTIZITÄT

Durch den Knockdown von cMet wurde die Notwendigkeit der Rezeptortyrosinkinase für die Gephyrinclusterung *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Über den spezifischen Liganden HGF konnte die Rezeptortyrosinkinase stimuliert und die Gephyrinclusterung mTOR-abhängig beeinflusst werden. Somit konnte gezeigt werden, dass cMet nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Gephyrinclusterung ist.

In der Literatur wurde bislang die Kolokalisation von cMet mit dem exzitatorischen Gerüstprotein PSD95 beschrieben [51]. Dass auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen cMet und inhibitorischen Synapsen besteht, konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen bestätigt werden [53, 71]. In dieser Arbeit wurde erstmals die morphologische Kolokalisation, basierend auf immunocytochemischen Färbungen, von cMet und Gephyrin untersucht und Evidenz für einen Zusammenhang zwischen der Rezeptortyrosinkinase und der Regulation inhibitorischer Synapsen gefunden. Ob die Kolokalisation im Körnerzellband des Gyrus Dentatus deutlich stärker ausgeprägt ist, als in proximalen und distalen Bereichen ist dennoch fraglich. Durch die quantitative Analyse der Kubus-Strukturen wurde nicht die Anzahl an tatsächlich vorhandenen Dendriten berücksichtigt. Lediglich die Dichte der Proteinstrukturen kann in diesem bestimmten Volumen quantifiziert werden, was wiederum keine Kompartiment-spezifischen Rückschlüsse zulässt.

Die *in vivo* Experimente zeigten, dass der Knockdown von cMet eine Reduktion der prä- und postsynaptischen Gerüstproteine induziert. Exzitatorische Marker wiesen keine Veränderung auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die Rezeptortyrosinkinase cMet an der Regulation und Aufrechterhaltung inhibitorischer Synapsen im Gyrus Dentatus adulter Ratten beteiligt ist. Zuvor konnte der regulatorische Effekt der Rezeptortyrosinkinasen EphA7 und TrkB bereits auf das Clusterverhalten von Gephyrin in hippocampalen Kulturen beschrieben werden [45, 46]. Zusammenfassend bestätigt dies die grundsätzliche, regulatorische Bedeutung von Rezeptortyrosinkinasen für die Gephyrinclusterdichte [72].

In den *in vitro* Analysen wurde durch den cMet Knockdown lediglich eine reduzierte Clusterdichte des postsynaptischen Gephyrins gemessen. Der inhibitorische Marker der Präsynapse VGAT, sowie

exzitatorische Veränderungen (PSD95, VGluT) konnten nicht festgestellt werden. Grund dafür könnte eine minder ausgeprägte Netzwerkstruktur des *in vitro* Systems sein. Die Isolation der hippocampalen Neurone aus den Embryonen und die anschließende Dissoziation des Gewebes brechen die natürliche Anordnung der Neurone komplett auf. Die ausgesäten Zellen bilden innerhalb der 96-well Platte ein komplett neues, randomisiertes Netzwerk aus, welches nicht mehr den ursprünglichen *in vivo* Bedingungen entspricht. Zwar wurden bereits Protokolle entwickelt, die das Messen einer Netzwerkaktivität in *in vitro* Kulturen von hippocampalen Ratten Neuronen ermöglichen und dem entsprechend synaptische Verbindungen voraussetzen [73], allerdings konnten nur für partielle Ausschnitte (etwa 60%) einer Kultur Aktivitäten gemessen werden. Zudem wurden in den experimentellen Ansätzen Zelldichten verwendet, bei denen eine immunocytochemische Quantifizierung der Fluoreszenzsignale auf Grund einer zu hohen Dichte deutlich erschwert wäre.

Grundsätzlich ist die Expression synaptischer Marker in corticalen Neuronen stärker als in hippocampalen Neuronen ausgeprägt [74]. Die Expression von Synaptophysin in *in vitro* Kulturen lässt Rückschlüsse darauf zu, ob synaptische Strukturen bereits voll entwickelt sind. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der Peak der Expression hippocampaler Kulturen bei DIV10 liegt, der Reifegrad der hier verwendeten *in vitro* Kultur also soweit fortgeschritten ist, dass Synapsen entwickelt sind. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass cMet die maximale Expression in hippocampalen *in vitro* Kulturen an DIV10-12 erreicht hat [75, 76]. Somit koinzidiert die Expression von cMet mit Synaptophysin was in Bezug auf die Messstrecke an synaptischen Veränderungen eine Quantifizierbarkeit an DIV10 ermöglichen sollte. Daraus ergibt sich, dass das *in vitro* System ein adäquates Surrogat-Modell ist um Knockdown-Effekte auf die Dichte synaptischer Marker zu analysieren.

In einigen Studien wird die Rezeptortyrosinkinase cMet im Kontext von exzitatorischen Synapsen beschrieben [51, 75, 77, 78]. Die Expression von cMet in Embryonen scheint an eine starke, temporale Regulation gebunden zu sein. Demnach wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Knockout oder die Extension des cMet Signals in corticalen Neuronen einen Effekt auf die intracorticale Reifung, Konnektivität und Plastizität haben könnte. So zeigten die Ergebnisse, dass ein zeitlich verlängertes cMet Signaling über die embryonale und frühe Expression hinaus, eine signifikante Reduktion an exzitatorischen Markern im visuellen Cortex von P14 Mäusen bewirkt [75]. In cMet Knockout Studien gleich alter Mäuse (P14) hingegen konnte keine signifikante Deregulation des Proteinlevels exzitatorischer Marker in der CA1 Region des Hippocampus gefunden werden [79]. Dieses Ergebnis stützt die hier erhobenen Daten, dass nach cMet Knockdown *in vitro* und *in vivo* kein signifikanter Effekt auf die Expression von PSD95 und VGluT gefunden wurde.

Zwar wurde in den Knockout-Studien ein Effekt in P14 Mäusen gefunden, allerdings wurde die synaptische Konnektivität in *in vitro* Kulturen, gar nicht untersucht. An DIV 7 wurde lediglich die Induzierbarkeit des cMet Rezeptors demonstriert, nicht jedoch seine regulatorischen Effekte auf synaptische Marker [78]. Eine Auswirkung veränderter cMet Level auf synaptische Strukturen im adulten Gyrus Dentatus der Ratte wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

Während diese Arbeit den Knockdown von cMet in den *in vivo* Experimenten im Gyrus Dentatus analysiert, fokussieren andere Studien auf den visuellen Cortex [75] oder die CA1 Region des Hippocampus [79]. Allerdings gibt es zwischen der CA1 Region und dem Gyrus Dentatus grundlegende Unterschiede in der Verschaltung und Funktionalität [80]. Dementsprechend ist die Rolle von cMet in beiden Arealen nicht zwingend gleichbedeutend. Der DG ist verantwortlich für das Prozessieren einkommender Informationen vom enthorinalen Cortex und leitet diese wiederum über die Moosfasern weiter an die CA3 Region. Von der CA3 Region gelangen die Signale zur CA1 Region, welches wiederum die Signale über das Subiculum aus dem Hippocampus ausleitet. Die Modulation synaptischer Signale im Gyrus Dentatus scheint im Vergleich zur CA1 Region zugunsten der Inhibition verstärkt zu sein. Dies ist unter anderem durch die erhöhte Anzahl an inhibitorischen Interneuronen im Gyrus Dentatus zu begründen [81]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Effekt von GABA_A Rezeptor Antagonisten (PicROTOXIN) einen stärkeren Effekt auf die Langzeitpotenzierung (LTP) im DG als im CA1 hatte. Vergleicht man inhibitorische und exzitatorische monosynaptische Antworten auf einen LTP Stimulus, zeigt sich im DG eine Inhibition, nicht jedoch im CA1 [82]. Auf Grund der unterschiedlichen molekularen Verschaltungen in der CA1 Region und im Gyrus Dentatus ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Effekte auf synaptische Verschaltungen zu erwarten sind.

Eine weitere Evidenz für die Hypothese, dass cMet an der Regulation inhibitorischer Synapsen beteiligt ist, stellt Elizabeth Powell mit Hilfe einer Met-Emx1 Mauslinie her. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigten, dass durch einen heterozygoten Knockout von cMet im thalamocorticalen Signalweg transgener Tiere eine dramatische Reduktion der postsynaptischen Inhibition induziert wurde [53]. Grund dafür sei eine reduzierte postsynaptische GABA_A Rezeptor-Dichte. Der Verlust der Inhibition und die daraus resultierende Übererregbarkeit der Neurone geben erste Hinweise auf epileptische Erkrankungen, aber auch auf die Entwicklungsstörung Autismus. Grundsätzlich ist ein Ungleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation Ausgangspunkt einer Autismus-Spektrum-Störung [83, 84]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Verlust von cMet im cerebralen Cortex und Hippocampus der Maus anatomische Veränderungen, ähnlich zu Patienten mit Autismus mit einem Single Nukleotid Polymorphismus im cMet Promotor (rs1858830, G→C) [85, 86], aufweist. Das humane rs1858830 C Allel im cMet Promotor resultiert in einer Reduktion der Gentranskription auf etwa 50% der cMet Expression [87]. Diese partielle Reduktion spricht für die Verwendung eines lentiviralen Knockdown-Systems, weil es einem physiologischen Expressionsniveau näherkommt als einem kompletten Knockout.

Die Promotor-Variante selbst scheint nur einen kleinen Effekt auf das Autismusrisiko zu haben und zeigt keine genetische Penetranz in einer auf Autismusdiagnose basierenden Population [88]. Es reicht also eine alleinige Modifikation des Risikogens cMet nicht aus, um eine Autismus Erkrankung zu verursachen.

In der Literatur wird der spezifische Ligand HGF an exzitatorischen Synapsen beschrieben [51]. Verstärkte mTOR Signaltransduktion korreliert sowohl in glutamatergen als auch in GABAergen Synapsen mit einer gesteigerten synaptischen Transmission [89]. In den Experimenten dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von hippocampalen Neuronen mit dem

Liganden HGF sowohl zu einer Phosphorylierung/ Aktivierung des Rezeptors selbst führt, als auch zu einer gesteigerten mTOR-abhängigen Gephyrinclusterung beiträgt. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die mTOR-abhängige Translation keine Auswirkungen auf das Expressionsniveau von Gephyrin hat [46]. Die Beteiligung von mTOR konnte mit der Untersuchung der phosphorylierten S6 Kinase und der Sensitivität der Gephyrinclusterung für Rapamycin deutlich herausgearbeitet werden. Bestätigend dazu konnte der stimulierende Effekt der HGF-Stimulation auf die S6 Kinase bereits in embryonalen Hepatocyten gezeigt werden [90]. Dass das Clustern des inhibitorischen Gerüstproteins grundsätzlich von mTOR abhängig ist, wurde in der Vergangenheit bereits ausführlich bewiesen [46, 60].

Mit dem hier eingesetzten Knockdownsystem konnte die Expression von cMet lokal und temporal präzise manipuliert werden. cMet scheint neben anderen Rezeptortyrosinkinasen einen Anteil an der Regulation inhibitorischer Gerüstprotein zu tragen. Da ein Zellsystem schnell und variabel auf Anforderungen und äußere Umstände reagieren muss, ist es denkbar, dass mehrere RTKs an der Bildung und Aufrechterhaltung der morphologischen Plastizität synaptischer Verschaltungen beteiligt sind.

11.1.2 TSC2 ALS SCHLÜSSELREGULATOR SYNAPTISCHER STABILISIERUNGSPROTEINE

Durch den Knockdown des mTOR Negativregulators TSC2 konnte bestätigt werden, dass die Gephyrinclusterung *in vitro* mTOR-abhängig angeregt werden kann. Konträr dazu bewirkte die inhibierte Expression von TSC2 im adulten Tier eine Reduktion sowohl inhibitorischen als auch exzitatorischen, synaptischer Marker.

Die TSC Proteine 1 und 2 stellen einen zentralen Knotenpunkt für die Weiterleitung von Signalen aus verschiedenen zellulären Pfaden dar. Eine wesentliche Aufgabe ist die Regulation der mTORC1-Aktivität. Über den TSC1/ TSC2 Komplex können die Informationen von mehreren Kaskaden integriert werden und über die Rheb GTPase auf mTOR und translationale Prozesse wirken.

Die Inaktivierung der TSC Protein-Funktion induziert eine Akkumulation der GTP-gebundenen Form von Rheb, die wiederum mTORC1 aktiviert [91]. Dies wiederum stützt die Annahme dieser Arbeit, dass die Aktivierung beziehungsweise Phosphorylierung von mTOR in hippocampalen Neuronen eine vermehrte Gephyrinclusterung einleitet. Allerdings steht dieses Ergebnis im Kontrast zu den *in vivo* Daten, welche signifikante Reduktionen von Gephyrin, GAD65 und den exzitatorischen Markern PSD95 und VGLuT aufwiesen.

Eine Erklärung für die *in vivo* Experimente könnten in dem Protein PRAS40, oder auch Akt1S1 [92] (Akt1 Substrat1) genannt, liegen. PRAS40 wird ubiquitär in den Zellen exprimiert und lokalisiert hauptsächlich im Kern [93]. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren wird PRAS40 über die PI3K- und PKB/Akt-abhängigen Signalwege phosphoryliert. Eine Phosphorylierung kann ebenfalls durch eine Insulinstimulation erzielt werden [94, 95]. PRAS40 ist assoziiert mit dem mTORC1 Komplex und wirkt als Inhibitor von mTOR. Für eine vollständige Aktivierung von mTORC1 ist eine Phosphorylierung von PRAS40 notwendig [96]. In Zellen mit einer verminderten TSC2 Expression konnte gezeigt werden, dass PRAS40 eine dauerhafte Inhibition von mTOR bewirkt und auf diese Weise eine konstitutive

Aktivierung verhindert [97]. Inaktiviertes mTOR ist assoziiert mit Gephyrin und vermindert somit die Translokation des Gerüstproteins zur Membranoberfläche.

Eine weitere Erklärung für die Unterschiede zwischen den *in vitro* und *in vivo* Experimenten könnte in den verschiedenen neuronalen Entwicklungsstufen begründet sein. Während das Zellkultursystem ein embryonales System ist und somit die Neurogenese in Ansätzen nachzeichnet können in diesem System hauptsächlich Effekte auf die Entstehung der neuronalen Konnektivität abgebildet werden. Im adulten System wiederum ist die Neurogenese bereits abgeschlossen und durch den Knockdown werden unabhängig von der Entwicklung bestehende Strukturen verändert.

Dass die synaptischen Veränderungen komplett unabhängig von mTOR zu sein scheinen, steht im Widerspruch zu dem Effekt des TSC2 Knockdown auf die S6 Kinase Phosphorylierung. Durch die Analyse des immunfluoreszenten Signals der lentiviral transduzierten Neurone des Gyrus Dentatus konnte ein geringe, aber dennoch signifikante Reduktion gemessen werden. Grundsätzlich wurde in dieser Arbeit das erste Mal ein Knockdown von TSC2 im Hippocampus der Ratte hinsichtlich seiner Effekte auf synaptische Marker untersucht. Es sind weitere Untersuchungen notwendig um zu bestätigen, dass mTOR an der Regulation synaptischer Marker beteiligt ist.

Die *in vivo* Daten zeigten, dass nach TSC2 Knockdown nicht nur inhibitorische, sondern auch exzitatorische Synapsen reduziert sind. In der Literatur lassen sich dazu bestätigende Daten finden. Allerdings wurden bislang keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen TSC2 und GABAergen Synapsen hergestellt. Die Zugabe von Bicuculline, einem spezifischen GABA_A Rezeptor Antagonist, zeigte im Vergleich zwischen normalen TSC^{+/+} und heterozygoten TSC^{+/-} Tieren keine signifikanten Veränderungen in den posttetanischen Potenzierungen (PTP= verstärkte Reizantwort nach hochfrequentem Stimulus). Dieses Ergebnis bedingt, dass GABAerge Synapsen in heterozygoten Tieren keine Veränderungen aufweisen. In elektrophysiologischen Studien wurde gezeigt, dass grundsätzlich die synaptische Plastizität im Hippocampus heterozygoter TSC2 Ratten reduziert ist [98]. Eine andere Arbeitsgruppe fokussierte die Abnormalitäten der dendritischen Spines in kultivierten TSC^{+/-} Maus-Neuronen. Mehrere Publikationen belegen, dass das heterozygote Mausmodell nicht nur in der Bildung dendritischer Spines [99], sondern auch der Langzeitdepression [100] und dem kognitiven Gedächtnis beeinträchtigt ist [101]. Durch immunocytochemische Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass in TSC^{+/-} Neuronen die Anzahl dendritischer Spines minimiert und exzitatorische Synapsen drastisch herunterreguliert waren. Allerdings konnte diese Deformation nicht durch die Gabe von Rapamycin widerhergestellt werden, was zu der Hypothese führt, dass die Veränderung durch die Rheb GTPase und nicht den mTOR Signalweg zu erklären sind.

11.1.3 TSC2- EIN FACETTENREICHES PROTEIN IM KONTEXT VON AUTISMUS-SPEKTRUM STÖRUNGEN

Die Ergebnisse der Doktorarbeit zeigen, dass TSC2 an der Regulation Glutamaterger und GABAerger Synapsen beteiligt ist. Veränderungen der synaptischen Transmission sind assoziiert mit Autismus-Spektrum-Störungen [102]. Etwa 1 Kind aus 6000 leidet unter TSC. Merkmale von ASD sind bei 30 bis 60% der Personen mit TSC vorhanden. Neuere Studien berichten über seltene Varianten in TSC1- und TSC2, die mit idiopathischer ASD assoziiert sind [103].

Die meisten Arbeiten belegen, dass der Grund für die vielfältigen Symptome der Erkrankung in einer Hyperaktivierung der mTORC1-Signalübertragung liegen. Die gesteigerte mTOR Aktivierung begünstigt aberrante, axonale und dendritische Konnektivität, verursacht eine Vergrößerung der Somata, erhöht zellulären Stress, vermindert Myelinisierung, induziert synaptische Dysfunktion und neuronale Übererregbarkeit [104, 105].

Neben körperlichen Veränderungen steht eine reduzierte TSC2 Aktivität im Verdacht auf molekularer Ebene die synaptische Plastizität zu beeinflussen. In einer Studie mit TSC-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Vigabatrin die refraktäre Epilepsie von Kindern nachweislich senkte [106, 107]. Vigabatrin ist ein Antiepileptikum, welches die GABA-Transaminase, ein Degradation-Protein des GABA Rezeptors, irreversibel inhibiert [108]. Auf diese Weise wird die Hemmung des GABA Rezeptors durch den fehlenden Abbau wiederhergestellt. Dieser Wirkungsmechanismus setzt voraus, dass die gestörte inhibitorische Neurotransmission auf der Funktionalität von GABA_A Rezeptoren beruht. Daraus ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen TSC2 und der Regulation GABAerger Synapsen.

Eine weitere Hypothese beschäftigt sich mit der Dysregulation des Kleinhirncortex, der an der Entstehung von ASD bei TSC-Patienten beteiligt sein könnte. Ein Maus-Modell, dem das TSC1 Gen in cerebellaren Purkinjellen fehlt, zeigte autistisch Verhaltenszüge, unter anderem Defizite in der sozialen Interaktion und vermehrtes repetitives Verhalten [109]. Ein ähnliches Symptom konnte bei einer TSC2 mutierten Mauslinie gezeigt werden [110]. In einer aktuellen Studie wurde aus TSC Patienten humane, induzierten Stammzellen generiert, welche wiederum zu Purkinjellen ausdifferenziert wurden. In diesem neuartigen Modellsystem konnte ebenfalls im Vergleich zwischen TSC Patienten mit ASD und gesunden Patienten eine synaptische Dysfunktion, und Übererregbarkeit gezeigt werden. Zusätzlich konnte durch elektrophysiologische Messungen bestätigt werden, dass die Zahl der funktionellen glutamatergen Synapsen in den TSC2-defizienten Purkinjellen im Vergleich zu den Kontrollen verringert waren. Dies wiederum stützt die hier erhobenen *in vivo* Daten, welche eine Reduktion der exzitatorischen synaptischen Marker nach TSC2 Knockdown aufwiesen. Erfreulicherweise war es sogar möglich, die Abnormitäten mit einer Rapamycinbehandlung *in vitro* zu reduzieren [110].

In einer weiteren Studie konnte eine geringere Konnektivität und Netzwerk-Synchronität von iPSC abgeleiteten Neuronen TSC2 defizienter Patienten gemessen werden [111]. Bei einer Analyse des RNA-Gehalts, stellte sich heraus, dass die Expression des präsynaptischen Markers GAD65/ 67, sowie der

postsynaptische GABA_A Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 1$ signifikant erhöht waren. Diese Ergebnisse stützen die *in vitro* Daten dieser Doktorarbeit, die ebenfalls eine Erhöhung der Gephyrinclusterung zeigten. Weiterhin bekräftigt das Patienten-abgeleitete Modell die Annahme, dass keine signifikante Deregulation der Synaptophysin und PSD95-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen vorliegt. Allerdings zeigt die Studie auch, dass die Expression von den glutamatergen Markern GRIN1, GRIA1, GRIN3A und VGLUT2 eine gesteigerte Expression aufwies. Zusammenfassend konnte die Studie jedoch zeigen, dass es zu einer Verschiebung der Balance zwischen erregenden und hemmenden Signalen in der synaptischen Transmission kommt. Dies verursacht eine Beeinträchtigung der Informationsverarbeitung, welche wiederum den Ausgangspunkt für einen potenziell pathophysiologischen Mechanismus für neuropsychiatrische Störungen wie ASD, Schizophrenie und Epilepsie darstellt [111].

Letztendlich gibt es eine Vielzahl an Modellsystemen, die sich mit der Funktionalität von TSC2 im Kontext von Autismus-Spektrum-Störungen auseinandersetzen. Ob man nun ein Tiermodell, ein Zellkulturmodell oder ein IPSC-abgeleitetes System verwendet, alle Ansätze haben gemein, dass sie eine Veränderung der synaptischen Transmission belegen.

11.1.4 DAS ENDOSOMALE KOMPARTIMENT ALS SCHAUPLATZ DER GEPHYRINTRANSLOKATION

Es konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass durch die Manipulation von frühen endosomalen Markern die Gephyrinclusterung beeinträchtigt werden kann. Durch das Eingreifen in den Reife- und Konversionsvorgang der endosomalen Kompartimente wurde die Aktivität von mTOR nachweislich reduziert und der Translokationsprozess von Gephyrin an die Membranoberfläche gemindert.

In eukaryotischen Zellen spielen Endosomen eine zentrale Rolle bei Recycling-Prozessen, dem Abbau von Proteinen und dem Translokieren von Membrankomponenten. Auf diese Weise organisiert das endosomale Kompartiment grundlegende Prozesse wie Nährstoffaufnahme, Signalübertragung, Adhäsion, Instandhaltung und Ausstattung der Membran. Endocytisierte Strukturen werden über das frühe Endosom an seinen Bestimmungsort transloziert. Nicht nur der Transport zur Plasmamembran, sondern auch das Signaling von Rezeptortyrosinkinasen wird über Endosome gesteuert. Beispielsweise wird aktiviertes cMet endocytisiert und degradiert um die Intensität des Signalings wieder abzuschwächen [112]. Im Golgi-Netzwerk werden endocytisierte Proteinstrukturen umgebaut, während sie in lysosomalen Kompartimenten vollständig degradiert werden. Die verschiedensten Kompartimente, die dafür notwendig sind zeichnen sich durch verschiedene GTPasen, die die Konformationsänderungen von dem einen in das nächste Reifestadium einleiten aus. Eine weitere wichtige Funktion hat die V-ATPase, eine Protonenpumpe, welche für die pH-Wert Ansäuerung von frühen und späten Endosomen/Lysosomen verantwortlich ist.

In früheren Studien wurde untersucht, ob es einen spezifischen Ort in der Zelle gibt, von dem der mTORC1 Komplex sein Signaling koordiniert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Aminosäure-, Insulin-Stimulationen, Hypoxie und den Glukosespiegel mTOR beeinflusst werden kann [113]. Kultiviert man beispielsweise Zellen in einem Kulturmedium ohne Aminosäuren, konnte dadurch die

Phosphorylierung von mTOR inhibiert werden. Ähnliches zeigte sich in den Zellen nach der Behandlung mit dem spezifischen mTOR Inhibitor Rapamycin. In den Zellen wurde Autophagy induziert [114]. Schlüsselpunkt dieses Mechanismus scheint die Rag GTPase zu sein. In einer Aminosäure deprivierten Umgebung ist die heterodimere Rag GTPase inaktiv [115]. Über eine Interaktion mit Ragulator ist Rag mit dem Lysosom assoziiert. Durch eine Aminosäure-Stimulation wird die Rag GTPase aktiviert, was eine unmittelbare Rekrutierung von mTORC1 zum Lysosom zur Folge hat. Ein weiterer Mechanismus zur Aktivierung von mTORC1 wird durch Wachstumsfaktoren induziert. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren ist TSC2 als Inhibitor von Rheb am Lysosom lokalisiert. Über die Stimulation wird der PI3/ Akt Signalweg aktiviert, was wiederum die Phosphorylierung von TSC2 sowie eine Dissoziation vom Lysosom einleitet. Die Rheb GTPase wird nicht mehr inhibiert und kann somit die Aktivierung von mTORC1 induzieren. Beide Aktivierungsmechanismen sind unabhängig voneinander notwendig, aber einzeln nicht hinreichend für eine Aktivierung von mTOR [115-117].

Welche Rolle spielt allerdings das Lysosom für die Aktivierung von mTOR? Durch mikroskopische Untersuchungen wurde festgestellt, dass auf der Oberfläche lysosomaler Kompartimente Rheb zu finden ist, welches wiederum Endpunkt des Insulin sensitiven PI3K Signalwegs ist [118, 119].

Berücksichtigt man nun, dass mTOR in inaktivem Zustand mit dem inhibitorischen Gerüstprotein Gephyrin assoziiert ist und bei Aktivierung eine Dissoziation und Translokation von Gephyrin an die Membranoberfläche induziert wird [46], stellt sich die Frage, ob durch die Manipulation des endosomalen Kompartiments die Gephyrin Translokation beeinträchtigt werden kann. In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression einer konstitutiv aktiven (Q79L) und dominant negativen (S34N) Variant des frühen endosomalen Markers Rab5A eine Reduktion der Gephyrinclusterung in hippocampalen Neuronen bewirkt. Des Weiteren konnte eine Reduktion der S6 Kinase Phosphorylierung nach Transfektion der konstitutiv aktiven Variante gemessen werden. In transfizierten Hek293T Zellen wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt. Die konstitutiv aktive Variante von Rab5A zeigt eine massive Reduktion der S6 Kinase Phosphorylierung [120]. Erklärt wurde die Inaktivierung von mTOR durch eine Immobilisierung an einem durch Transfektion neu entstandenem Hybridendosom. Grundsätzlich zeichnet sich die konstitutiv aktive Rab5A Variante durch eine 3x höhere Bindungsaffinität zu GTP als die Wildtyp Version aus und sorgt für eine Vergrößerung der frühen Endosome, indem die Verschmelzung mit anderen frühen Endosomen gefördert wird. [121]

Das Hybridendosom scheint allerdings nicht nur ein vergrößertes, frühes Endosom zu sein, sondern wurde beschrieben als eine Verschmelzung aus frühen und späten endosomalen Kompartimenten, welches sowohl Marker für das frühe Endosom (EEA1) als auch lysosomale Marker (LAMP2) aufwies. Die Überexpression von Rheb konnte die mTOR Aktivität wiederherstellen, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Lokalisation von mTOR an das Hybridendosom die Interaktion mit endogenem Rheb unterbindet. Die Überexpression von Wildtyp und dominant negativen Rab5A Mutanten zeigten einen weniger ausgeprägten Effekt auf die S6 Kinase Phosphorylierung [120]. Dies lässt sich nur teilweise mit den hier erhobenen Daten in Einklang bringen. Für die dominant negative Rab5A Variante konnte eine Reduktion, bei der Überexpression mit Rab5A-Wildtyp allerdings kein

Effekt auf die Gephyrinclusterung in transfizierten hippocampale Neurone festgestellt werden. Allerdings wurde in der erwähnten Studie auch nur das direkte Zielprotein von mTOR betrachtet und keine weiteren Interaktionen untersucht.

Die Familie der Rab-GTPasen ist konserviert in Säugetieren. Etwa 70 verschiedene sind allein in humanen Zellen beschrieben. Alle zeichnen sich aus durch eine GTPase Aktivität. So lassen sich neben Rab5A, welches ein spezifischer Marker für das frühe Endosom ist, weitere Rab Proteine im endosomalen Kompartiment wiederfinden. Beispielsweise ist Rab4 beteiligt am vesikulären Verkehr innerhalb der Zelle und verantwortlich für Recyclingprozesse [122]. An späten endosomalen Kompartimenten hingegen ist Rab7 zu finden. Rab7 ist unter anderem beteiligt an der Konversion vom frühen zum späten Endosom und dem Transport vom späten Endosom zum Lysosom [123]. In den Transport vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgiapparat ist wiederum Rab8 verwickelt [124]. Ein weiteres Rab Protein lässt sich im intrazellulären Membran Trafficking finden, Rab11 [125]. Am Lysosom selbst findet die Aktivierung von mTOR statt [126]. Durch die Überexpression der Rab Proteine 4, 7, 8 und 11, welche an anderen endosomalen Strukturen lokalisiert sind, konnte keine signifikante Veränderung im Kontext der Gephyrinclusterung detektiert werden. Recycling-Endosome oder lysosomale Kompartimente sind folglich nicht an der mTOR-Aktivierung beteiligt. Dieses Ergebnis wird gestützt durch die unveränderte S6 Kinase Phosphorylierung in HEK293T Zellen, auch hier konnte kein signifikanter Effekt von anderen Rab Proteinen festgestellt werden [120]. Somit ergibt sich, dass der endosomale Transport keine Rolle für die Bildung der inhibitorischen Gerüststruktur spielen. Des Weiteren kann ausgeschlossen werden, dass Recycling-Prozesse für die Gephyrinclusterung notwendig sind.

Eine andere Publikation fokussiert das für das frühe Endosom spezifische Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) im Kontext der Bildung von inhibitorischen Postsynapsen. Mit Hilfe eines membrangängigen PI3P-Derivats wurde gezeigt, dass PI3P wichtig für die Collybistin vermittelte Rekrutierung von Gephyrin an die Membranoberfläche ist [127]. PI3P ist das Produkt der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K oder Vps34). In einer weiteren Studie konnte im Gegensatz zu der behaupteten exklusiven Lokalisation von PI3P an frühen Endosomen gezeigt werden, dass PI3P auch auf späten Endosomenmembranen zu finden ist [128]. In *Vps34^{-/-}* Maus embryonischen Fibroblasten war ein starker Anstieg des Rab7-GTP-Spiegels zu sehen und eine Vergrößerung der späten Endosomen. Die Überaktivierung von Rab7 wurde begründet durch das fehlende Rekrutieren des Rab7-GTPase aktivierenden Proteins Armus, welches an PI(3)P bindet. Zusammenfassend konnte die Studie zeigen, dass Vps34 eine wesentliche Rolle für die Regulation von Rab7 und späten Endosome spielt [128, 129]. Interessanterweise war Vps34 ein auffälliger Kandidat im siRNA basierten Screening, bei dem eine Reduktion der Gephyrinclusterdichte detektiert wurde [45].

Letztendlich ist es nicht bekannt, ob es ein exklusives Kompartiment gibt, an dem die Translokation von Gephyrin an die Membranoberfläche induziert wird. Durch die Transfektion hippocampaler Neurone mit Rab5A Varianten konnte gezeigt werden, dass die endosomale Konversion einen kritischen Aspekt in der Regulation der Gephyrintranslokation darstellt.

11.1.5 DREI VERSCHIEDENE BLICKWINKEL AUF EIN PROTEIN UND EINE KRANKHEIT

Durch diese Arbeit wurden unterschiedliche Blickwinkel auf die Regulation synaptischer und vor allem inhibitorischer Marker gelegt, die zur Stabilisierung GABAerger Synapsen notwendig sind und im Zusammenhang mit Autismus-Spektrum-Störungen stehen.

Es wurde herausgearbeitet, dass das endosomale System eine mTOR abhängige Schlüsselrolle für die Regulation inhibitorischer Synapsen hat, aber ist es auch relevant für die Neuropathologie von Autismus? Viele zelluläre Entwicklungsprozesse hängen von der Endozytose, dem endosomalen Transport, Recycling und der Degradation ab. Es stellt sich immer mehr heraus, dass der endosomale Signalweg bei einer Reihe von neuronalen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Studien belegen, dass in Neuronen Rab5 und Rab7 maßgeblich den endosomalen Verkehr an der Postsynapse organisieren [130]. Viele endosomale Signalwege wurden bereits im Kontext von ASD beschrieben [131, 132]. Rab5A ist, wie bereits ausführlich diskutiert wurde, ein essenzieller Modulator der frühen Endosom Bildung und Reifung zum späten Endosom/ Lysosom. Die Lokalisation von mTORC1 und TSC2 an das späte Endosom/Lysosom in Abhängigkeit ihres jeweiligen Aktivierungsstatus weist auf einen regulatorischen Einfluss des endosomalen Kompartimente auf die beiden Proteine hin. Überraschenderweise wurde herausgefunden, dass TSC2 eine spezifische GAP-Aktivität für Rab5 hat [133].

TSC2 ist ebenfalls in der SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) Datenbank mit einem Score von 1 gelistet. Gene mit diesem Score stehen eindeutig im Zusammenhang mit ASD. Neben seiner Bedeutung für ASD zeigte TSC2 in den hier durchgeführten Experimenten einen starken Effekt auf die Regulation sowohl inhibitorischer, als auch exzitatorischer Marker. In gleicher Weise ist auch die Rezeptortyrosinkinase cMet in der Datenbank zu finden (Score 2). In einigen Studien wurde die Relevanz von cMet für ASD und die Regulation exzitatorischer Synapsen bereits herausgearbeitet. Durch die Daten dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen cMet und inhibitorischen Synapsen hergestellt werden.

Zusammenfassend haben cMet, TSC2 und der endosomale Signalweg einen Effekt auf synaptische Strukturen und lassen sich in der Literatur alle mit einer starken Evidenz für Autismus verbinden. Aus den drei verschiedenen Komponenten ergibt sich folgendes, hypothetisches Schema:

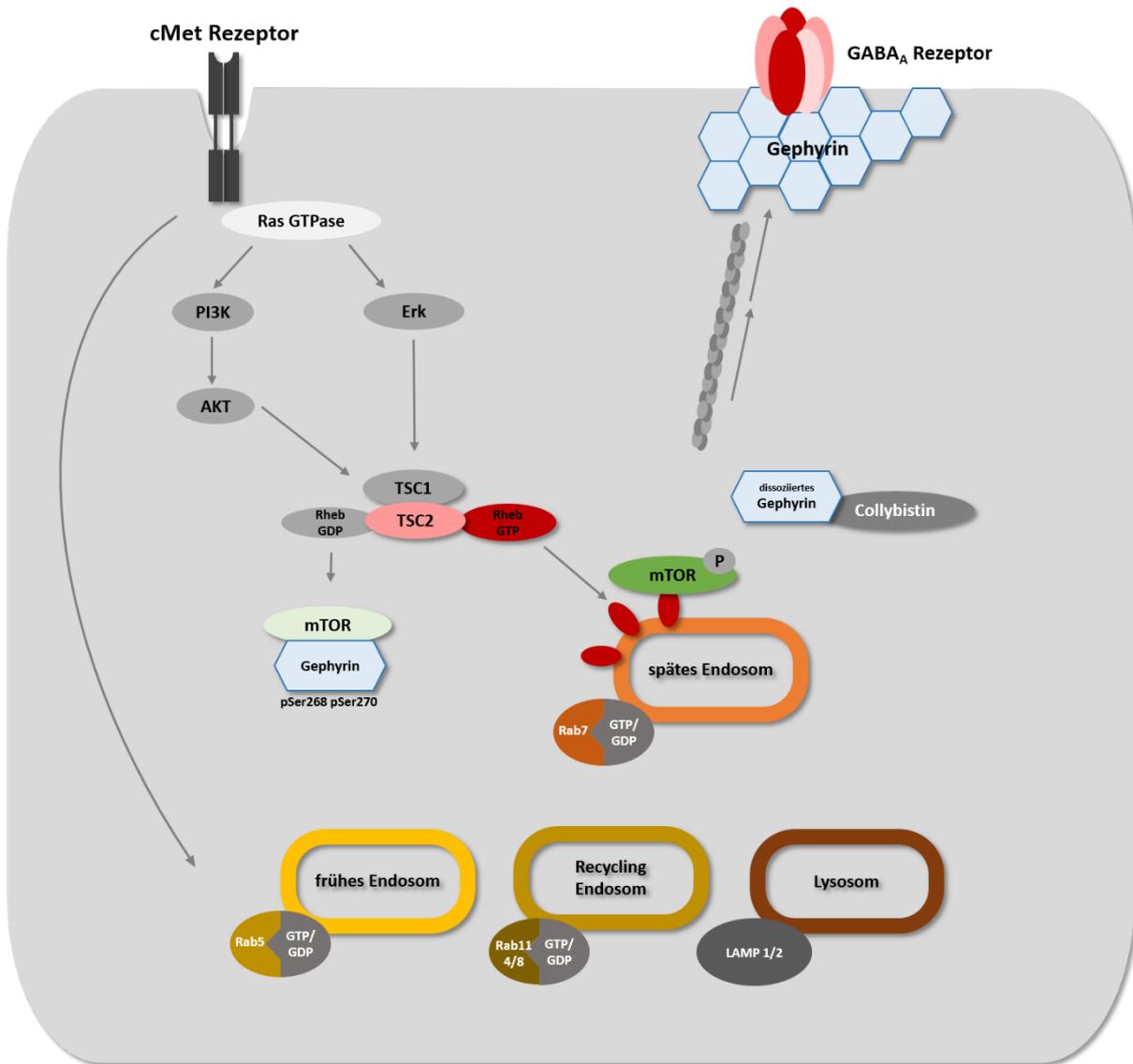


Abbildung 25: schematisch, hypothetische Darstellung der cMet Signaling Kaskade

Wird der cMet Rezeptor durch seinen Liganden HGF stimuliert, kommt es zu einer Homodimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der Ras GTPase. Über den PI3k- oder den Erk- Signalweg wird der TSC Komplex aktiviert. TSC2 hat eine inhibierende Wirkung auf die Rheb GTPase. Liegt Rheb GTP gebunden vor führt dies zu einer Phosphorylierung von mTOR. Dies wiederum führt zu einer Dissoziation von mTOR und Gephyrin. Die Dissoziation findet am späten Lysosom statt. Nachfolgend wird Gephyrin von Collybistin gebunden und über Mikrotubuli-Strukturen an die Membranoberfläche der Zelle transloziert. Dort bildet Gephyrin eine hexagonale Gerüststruktur aus, die zur Stabilisierung von GABA_A Rezeptoren benötigt wird.

12 AUSBLICK

Durch HGF-Stimulation, Rapamycin/PHA-Behandlungen und anschließende immunocytochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Gephyrinclusterung in hippocampalen Zellen verstärkt wird. Zur Ergänzung der erhobenen Daten wäre es ratsam eine zusätzliche, unabhängige Proteinquantifizierung durchzuführen (Western Blot).

mTOR ist in inaktivem Zustand mit Gephyrin assoziiert [46] und wird an späten Endosomen/Lysosomen aktiviert [91]. Die immunocytochemische Darstellung und Auswertung einer Kolo-kalisation von Gephyrin an späten Endosomen konnte nicht dargestellt werden. Zur weiteren Exploration des Translokationsursprungs von Gephyrin könnte man ein virales Konstrukt erstellen, das Gephyrin getagged mit einer Biotinylierungssequenz exprimiert. Auf diese Weise könnten in infizierten Zellen nach Biotin Zugabe mit Gephyrin interagierende oder proximal lokalisierte Proteine aufgereinigt werden. Über einen Western Blot könnte so überprüft werden ob beispielsweise Rab7 oder andere Proteine des späten Endosoms mit Gephyrin interagieren [132].

Zur Überprüfung der Funktionalität der lentiviralen miRNA Konstrukte könnte eine Transkriptomanalyse infizierter hippocampaler Neurone durchgeführt werden. Eventuell lassen sich schon hier signifikante deregulierte Expressionsmuster im Vergleich zu kontroll- transfizierten Zellen finden. Des Weiteren kann durch eine Transkriptomanalyse ein viel breiteres Spektrum an Fehlregulationen aufgedeckt werden.

Zudem wäre es für zukünftige Experimente denkbar und interessant ein iPSC abgeleitetes Modell TSC defizienter Patienten mit ASD zu etablieren und zu untersuchen. Durch die Ausdifferenzierung von Neuronen könnte man nicht nur die Netzwerkaktivität über Calciumimaging untersuchen, sondern auch Effekt auf die endosomalen Kompartimente studieren. Es wäre spannend zu untersuchen, ob mit einem Patienten-abgeleiteten Modell ähnliche Auswirkungen auf die synaptische Regulation gemessen werden können, wie in dieser Arbeit. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Validierung von cMet in solch einem Modellsystem. Da man nicht davon ausgehen kann, dass der Patient eine Mutation in dem zu Grunde liegenden Gen aufweist, könnte man analysieren ob die TSC Defizienz einen möglichen Effekt auf die Regulation der Rezeptortyrosinkinase hat. Letztlich wäre es auch denkbar ein Organoid aus den ausdifferenzierten Neuronen zu züchten und die synaptische Konnektivität in einer dreidimensionalen Struktur zu untersuchen.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Surrogat-Modelle (*in vitro* und *in vivo*) verwendet um Evidenzen zu finden, dass cMet, TSC2 und die endosomale Kompartimentierung an der Regulation synaptischer Strukturen beteiligt sind. Um dieses Grundlagenmodell auch im menschlichen System zu untersuchen wäre es interessant humanes, hippocampales Gewebe zu untersuchen. Dies wäre einerseits möglich durch Proben von post mortem Gehirnen oder durch Resektions-Proben, von Patienten, die an einer Temporallappenepilepsie leiden. An post mortem Gehirnen von Kontroll- und Patienten- Gruppen könnten lediglich immunocytochemische Quantifizierungen vorgenommen werden um synaptische Veränderungen zu quantifizieren.

Das Spannende an Resektionsproben des medialen Temporallapens hingegen ist, dass in Patientenkohorten mit dieser Erkrankung oftmals eine Korrelation mit Autismus und TSC2 Mutationen gegeben ist [134-136]. Zudem würde das resezierte Gewebe weitaus mehr Untersuchungs-Möglichkeiten bieten. Da das Gewebe immer noch vital ist, könnten neben elektrophysiologische Ableitungen, die Aufschluss darüber geben in welchem Verhältnis Exzitation zu Inhibition stehen, auch Transkriptomanalysen sowie immunocytochemische Färbungen durchgeführt werden.

13 ANHANG

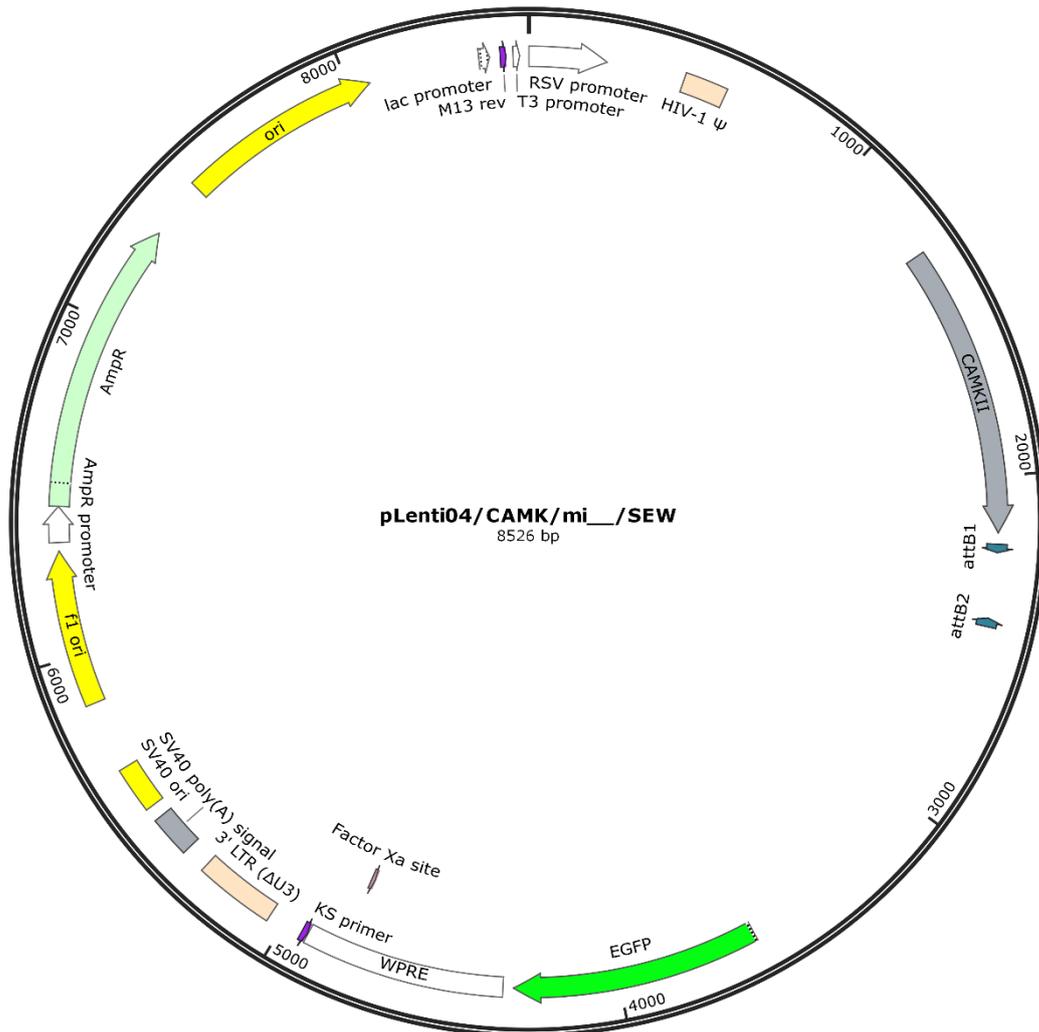
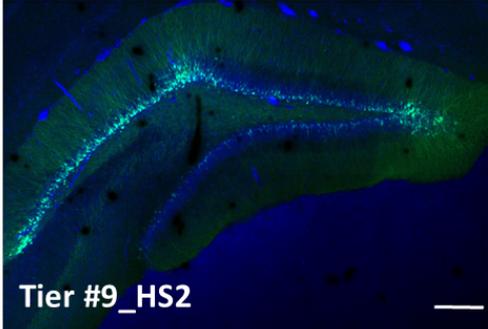
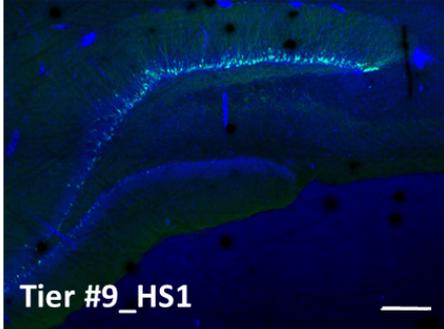
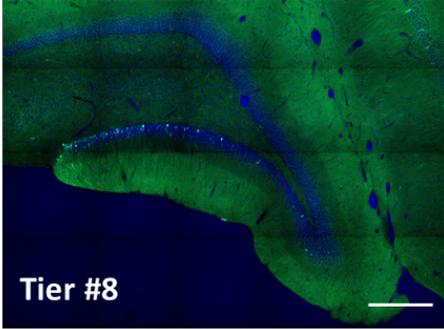
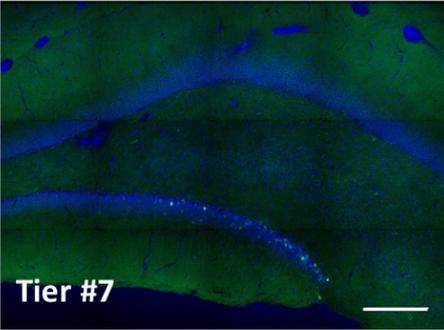
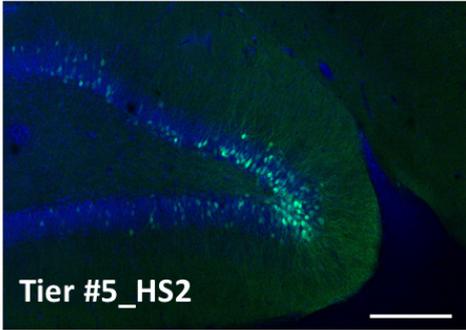
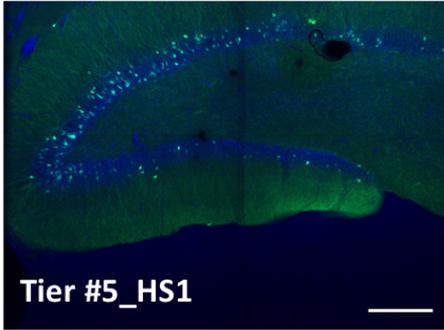
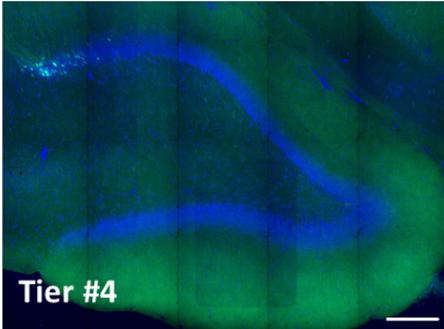
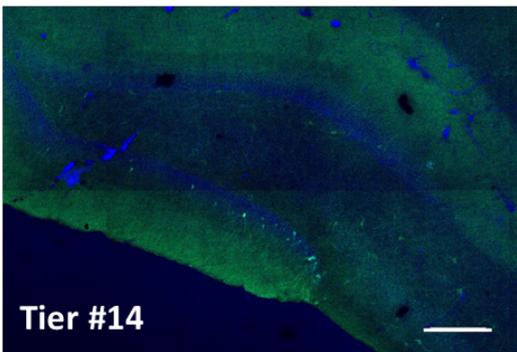
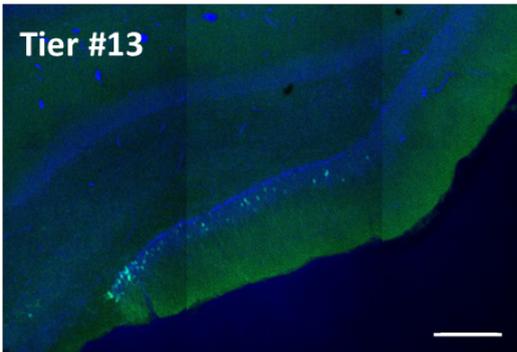
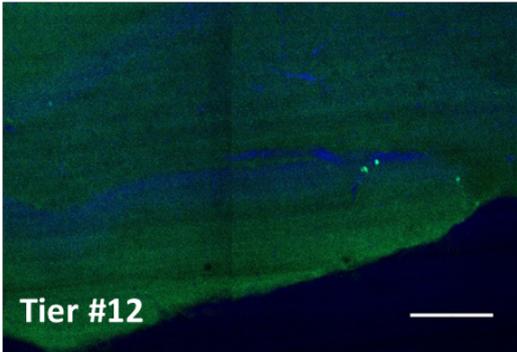
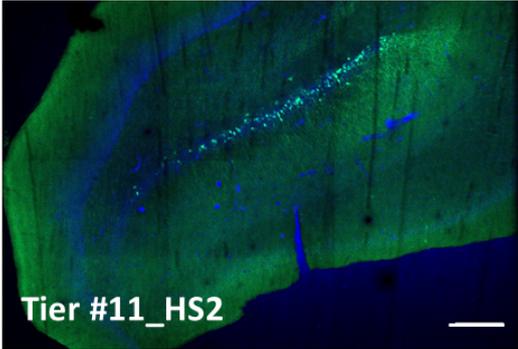
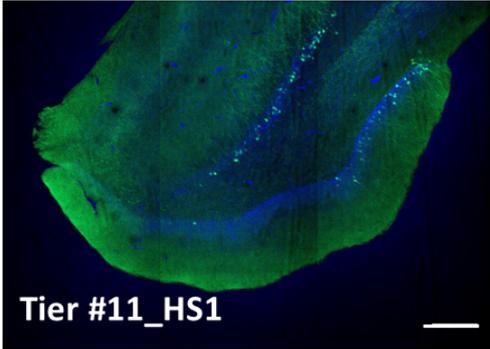
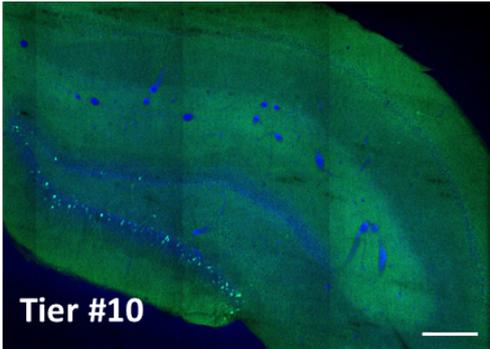


Abbildung 26: Lentiviraler Expressionsvektor

Die verwendeten miRNAs für den cMet und TSC2 Knockdown wurden in den Vektor pLenti04/CAMK/mi_/SEW überführt. Die miRNA wird nach einem CAMKII Promotor exprimiert. Anstelle einer Blastizidinresistenz befindet sich eine durch einen Synapsin-Promotor kontrollierte EGFP-Kassette, auf die eine WPRE-Einheit folgt (SEW).

13.1.1 ÜBERSICHT DER INJEKTIONEN IN DEN GYRUS DENTATUS DER RATTE





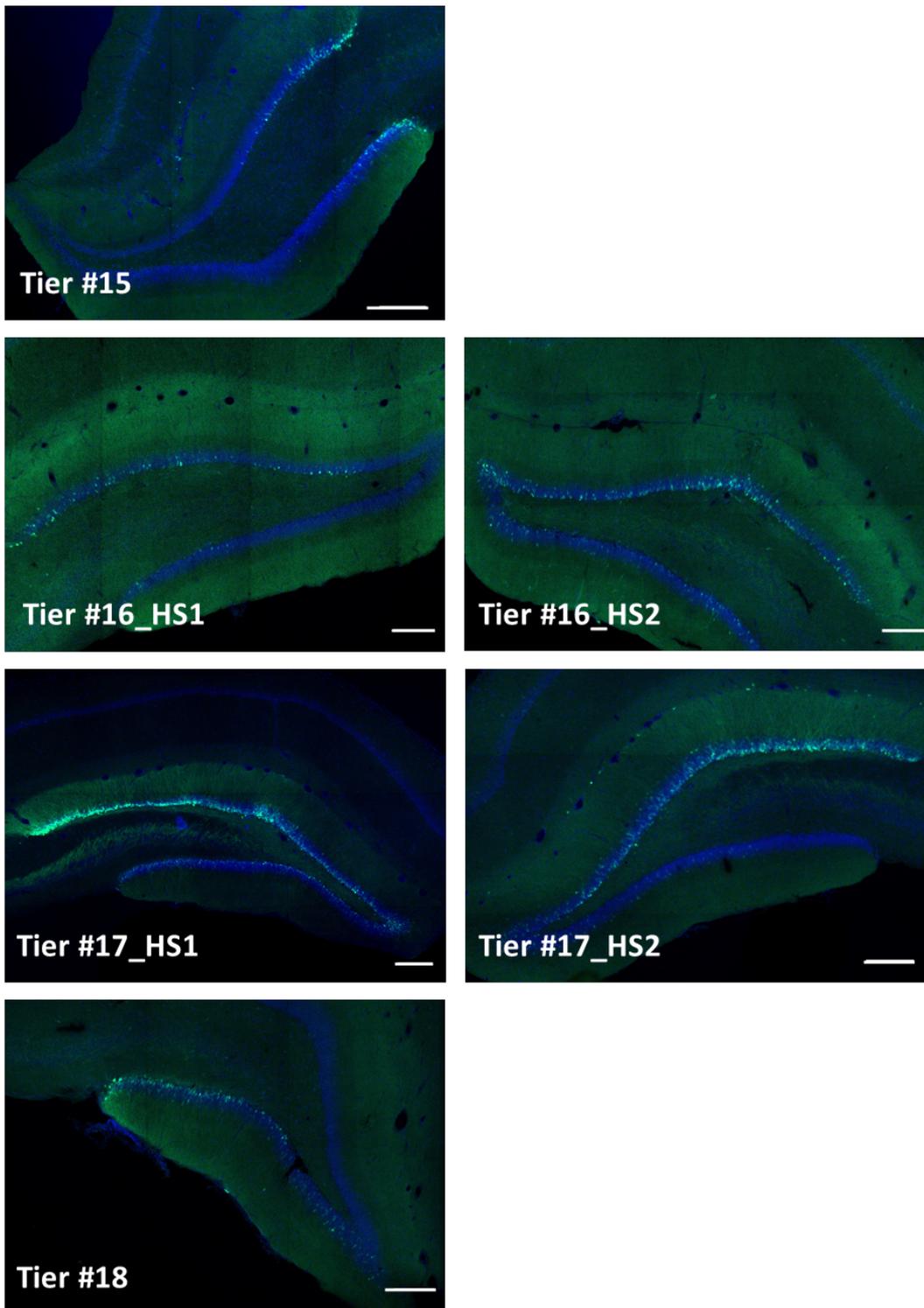


Abbildung 27: Injektionstreffer der cMet/TSC2 injizierten lentiviralen Konstrukte in den Gyrus Dentatus von 3 Monate Ratte

Gezeigt sind die lentiviralen Injektionen der CTR (Tier #9 und #14), mi3923 (Tier #5, #10, #11), miUTR (Tier #12, #13), mi500 (Tier #15, #16) und mi2675 (Tier #17, #18) injizierten Tiere (HS= Hemisphäre). In grün die lentiviral injizierten Neurone (SEW Expression), in blau eine Hoechstfärbung zur Darstellung der Zellkerne. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm.

13.1.2 EINZELDATEN DER STEREOTAKTISCHEN INJEKTION DES CMET KD IN DEN DG

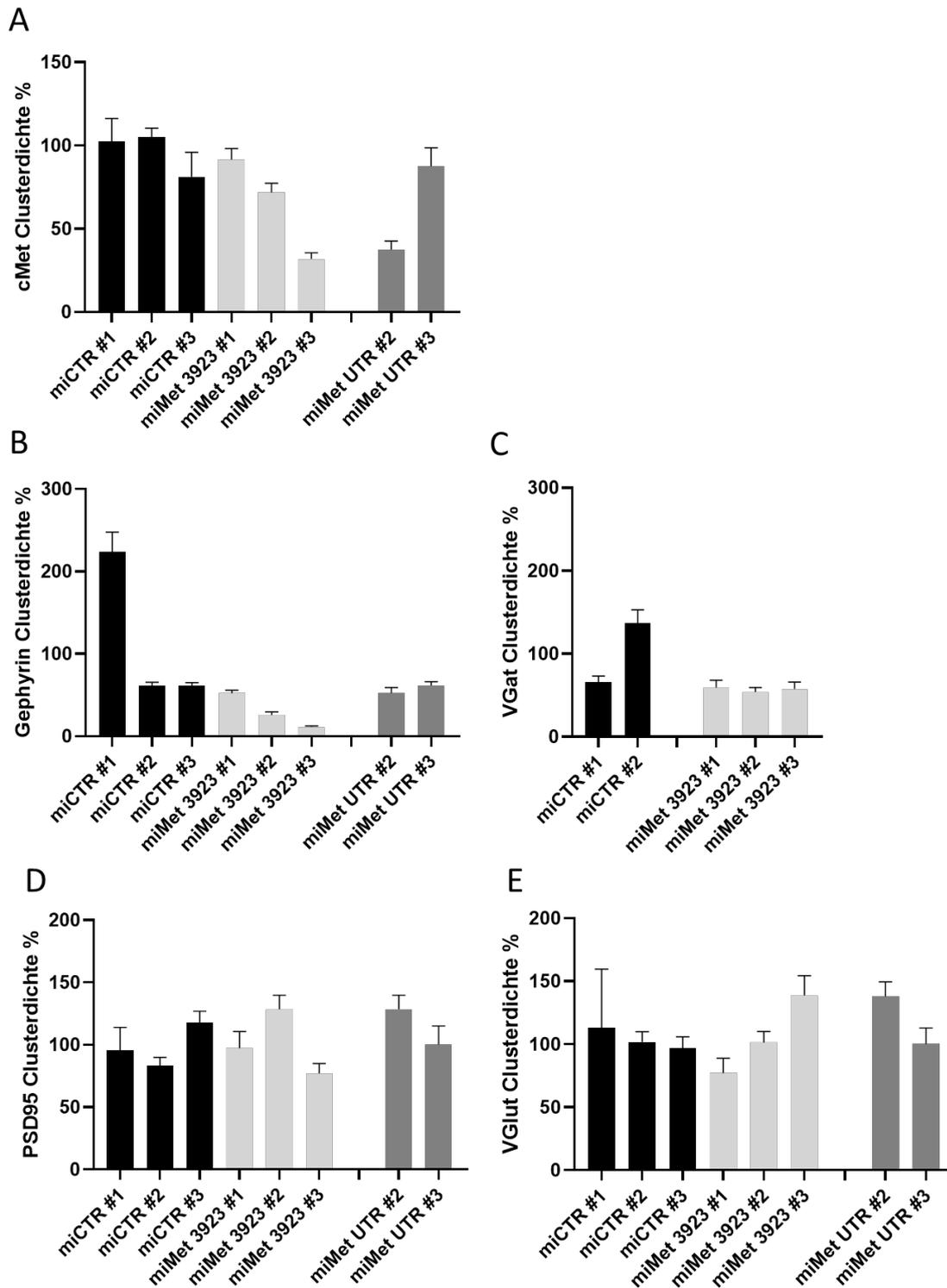


Abbildung 28: Einzeldaten der stereotaktischen cMet Knockdown Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte

Alle Grafen präsentieren die Daten der einzelnen injizierten Tiere. **A:** Quantifizierung der cMet Clusterdichte. **B:** Quantifizierung der Gephyrin Clusterdichte. **C:** Quantifizierung der VGAT Clusterdichte. **D:** Quantifizierung der PSD95 Clusterdichte. **E:** Quantifizierung der VGLut Clusterdichte. Es wurde keine statistische Analyse erhoben. Fehlerbalken=SEM.

13.1.3 EINZELDATEN DER STEREOTAKTISCHEN INJEKTION DES TSC2 KD IN DEN DG

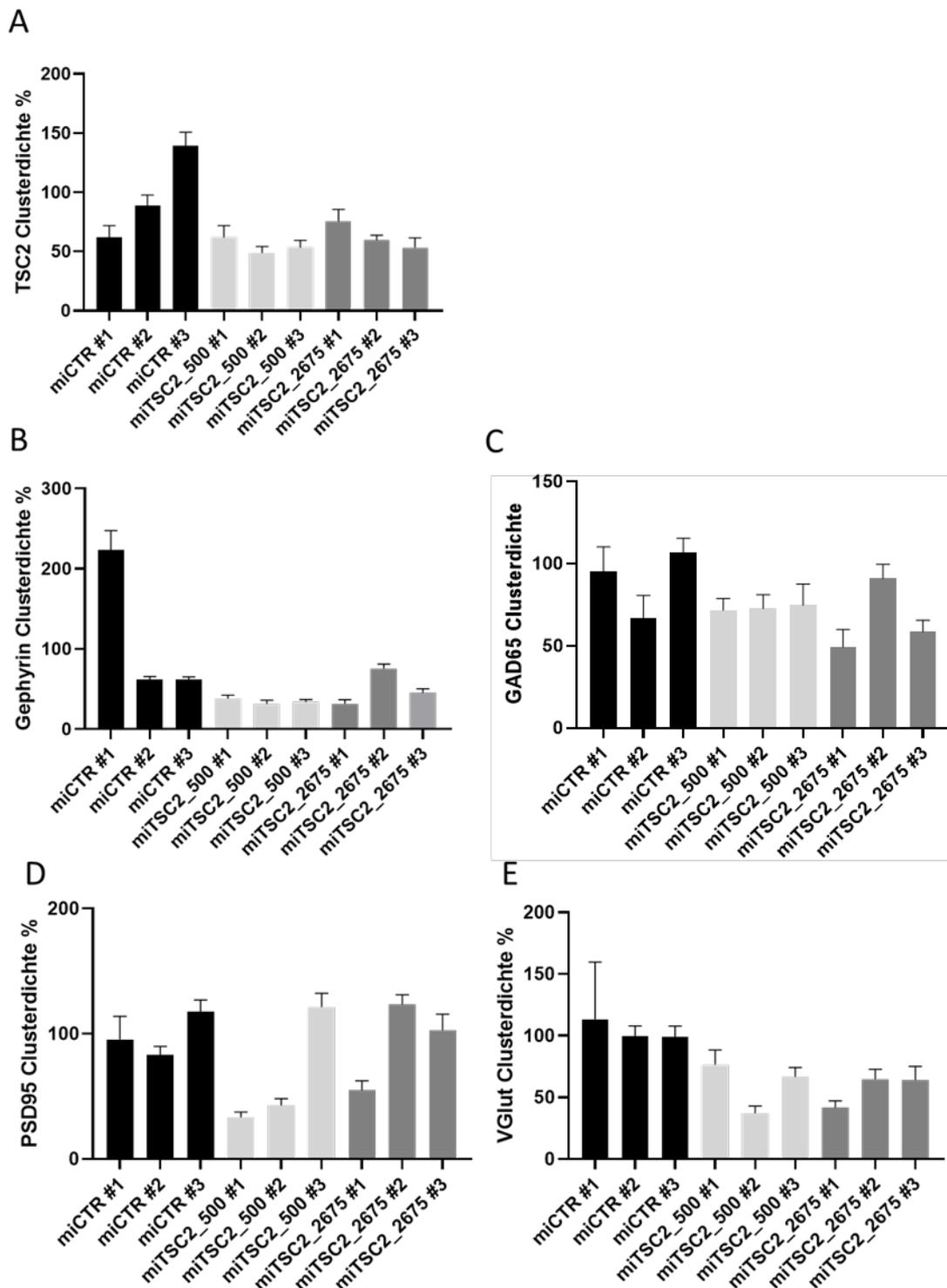


Abbildung 29: Einzeldaten der stereotaktischen TSC2 Knockdown Injektion in den Gyrus Dentatus der Ratte

Alle Grafen präsentieren die Daten der einzelnen injizierten Tiere. **A:** Quantifizierung der TSC2 Clusterdichte. **B:** Quantifizierung der Gephyrin Clusterdichte. **C:** Quantifizierung der VGAT Clusterdichte. **D:** Quantifizierung der PSD95 Clusterdichte. **E:** Quantifizierung der VGlut Clusterdichte. Es wurde keine statistische Analyse erhoben. Fehlerbalken=SEM.

14 LITERATURVERZEICHNIS

1. Jeckel, P., *Masterarbeit*. 2017.
2. Kandel ER, S.J., Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ., *Principles of Neural Science*. 2013.
3. von Bartheld, C.S., J. Bahney, and S. Herculano-Houzel, *The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting*. *J Comp Neurol*, 2016. **524**(18): p. 3865-3895.
4. Yang, Y. and J.Z. Wang, *From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits*. *Front Neural Circuits*, 2017. **11**: p. 86.
5. Dixon, M.L., et al., *Emotion and the prefrontal cortex: An integrative review*. *Psychol Bull*, 2017. **143**(10): p. 1033-1081.
6. Babaev, O., C. Piletti Chatain, and D. Krueger-Burg, *Inhibition in the amygdala anxiety circuitry*. *Exp Mol Med*, 2018. **50**(4): p. 18.
7. Parfitt, G.M., et al., *Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviors in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex*. *Neuropsychopharmacology*, 2017. **42**(8): p. 1715-1728.
8. Cominski, T.P., et al., *The role of the hippocampus in avoidance learning and anxiety vulnerability*. *Front Behav Neurosci*, 2014. **8**: p. 273.
9. Pelkey, K.A., et al., *Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons*. *Physiol Rev*, 2017. **97**(4): p. 1619-1747.
10. Bowler, D.M., J.M. Gardiner, and N. Berthollier, *Source memory in adolescents and adults with Asperger's syndrome*. *J Autism Dev Disord*, 2004. **34**(5): p. 533-42.
11. Ring, M., S.B. Gaigg, and D.M. Bowler, *Relational Memory Processes in Adults with Autism Spectrum Disorder*. *Autism Res*, 2016. **9**(1): p. 97-106.
12. Dager, S.R., et al., *Shape Mapping of the Hippocampus in Young Children with Autism Spectrum Disorder*. *American Journal of Neuroradiology*, 2007. **28**(4): p. 672-677.
13. Gaarskjaer, F.B., *Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells*. *J Comp Neurol*, 1978. **178**(1): p. 49-72.
14. Lawrence, J.J., Z.M. Grinspan, and C.J. McBain, *Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus*. *J Physiol*, 2004. **554**(Pt 1): p. 175-93.
15. Rotzinger, S. and F.J. Vaccarino, *Cholecystokinin receptor subtypes: role in the modulation of anxiety-related and reward-related behaviours in animal models*. *J Psychiatry Neurosci*, 2003. **28**(3): p. 171-81.
16. Baimbridge, K.G., M.R. Celio, and J.H. Rogers, *Calcium-binding proteins in the nervous system*. *Trends Neurosci*, 1992. **15**(8): p. 303-8.
17. Raza, S.A., et al., *HIPP neurons in the dentate gyrus mediate the cholinergic modulation of background context memory salience*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 189.
18. Miles, R., et al., *Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus*. *Neuron*, 1996. **16**(4): p. 815-23.
19. Freund, T.F. and G. Buzsáki, *Interneurons of the hippocampus*. *Hippocampus*, 1996. **6**(4): p. 347-470.
20. Won, S., et al., *MAGUKs: multifaceted synaptic organizers*. *Curr Opin Neurobiol*, 2017. **43**: p. 94-101.
21. Martineau, M., et al., *VGLUT1 functions as a glutamate/proton exchanger with chloride channel activity in hippocampal glutamatergic synapses*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 2279.
22. Chua, H.C. and M. Chebib, *GABA(A) Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology*. *Adv Pharmacol*, 2017. **79**: p. 1-34.
23. Krueger-Burg, D., T. Papadopoulos, and N. Brose, *Organizers of inhibitory synapses come of age*. *Curr Opin Neurobiol*, 2017. **45**: p. 66-77.
24. Barberis, A., *Postsynaptic plasticity of GABAergic synapses*. *Neuropharmacology*, 2020. **169**: p. 107643.

25. Groeneweg, F.L., et al., *Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond*. Histochem Cell Biol, 2018. **150**(5): p. 489-508.
26. Pizzarelli, R., et al., *Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions*. Neuroscience, 2020. **439**: p. 125-136.
27. Danielson, E., et al., *S-SCAM/MAGI-2 is an essential synaptic scaffolding molecule for the GluA2-containing maintenance pool of AMPA receptors*. J Neurosci, 2012. **32**(20): p. 6967-80.
28. Feng, G., et al., *Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1321-4.
29. Pfeiffer, F., D. Graham, and H. Betz, *Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord*. J Biol Chem, 1982. **257**(16): p. 9389-93.
30. Sander, B., et al., *Structural characterization of gephyrin by AFM and SAXS reveals a mixture of compact and extended states*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013. **69**(Pt 10): p. 2050-60.
31. Fritschy, J.M. and P. Panzanelli, *GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system*. Eur J Neurosci, 2014. **39**(11): p. 1845-65.
32. Chooi, G. and J. Ko, *Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer*. Exp Mol Med, 2015. **47**: p. e158.
33. Ramming, M., et al., *Diversity and phylogeny of gephyrin: tissue-specific splice variants, gene structure, and sequence similarities to molybdenum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10266-71.
34. Maas, C., et al., *Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin*. J Cell Biol, 2006. **172**(3): p. 441-51.
35. Fuhrmann, J.C., et al., *Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5393-402.
36. Saiepour, L., et al., *Complex role of collybistin and gephyrin in GABAA receptor clustering*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29623-31.
37. Kins, S., H. Betz, and J. Kirsch, *Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin*. Nat Neurosci, 2000. **3**(1): p. 22-9.
38. Chiou, T.T., et al., *Differential regulation of the postsynaptic clustering of γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors by collybistin isoforms*. J Biol Chem, 2011. **286**(25): p. 22456-68.
39. Papadopoulos, T. and T. Soykan, *The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: facts and open questions*. Front Cell Neurosci, 2011. **5**: p. 11.
40. Gundersen, R.Y., et al., *Glycine--an important neurotransmitter and cytoprotective agent*. Acta Anaesthesiol Scand, 2005. **49**(8): p. 1108-16.
41. Shaw, G.L. *Donald Hebb: The Organization of Behavior*. 1986. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
42. Greenwood, P.M., *Functional plasticity in cognitive aging: review and hypothesis*. Neuropsychology, 2007. **21**(6): p. 657-73.
43. Du, Z. and C.M. Lovly, *Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 58.
44. Wybenga-Groot, L.E., et al., *Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region*. Cell, 2001. **106**(6): p. 745-57.
45. Wuchter, J., et al., *A comprehensive small interfering RNA screen identifies signaling pathways required for gephyrin clustering*. J Neurosci, 2012. **32**(42): p. 14821-34.
46. Beuter, S., et al., *Receptor tyrosine kinase EphA7 is required for interneuron connectivity at specific subcellular compartments of granule cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29710.
47. Filosa, A., et al., *Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport*. Nat Neurosci, 2009. **12**(10): p. 1285-92.
48. Trusolino, L., A. Bertotti, and P.M. Comoglio, *MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 834-48.
49. Rodrigues, G.A. and M. Park, *Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 1994. **9**(7): p. 2019-27.
50. Ponzetto, C., et al., *A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family*. Cell, 1994. **77**(2): p. 261-71.

51. Tyndall, S.J. and R.S. Walikonis, *The receptor tyrosine kinase Met and its ligand hepatocyte growth factor are clustered at excitatory synapses and can enhance clustering of synaptic proteins*. Cell Cycle, 2006. **5**(14): p. 1560-8.
52. Lim, C.S. and R.S. Walikonis, *Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway*. Cell Signal, 2008. **20**(5): p. 825-35.
53. Lo, F.S., R.S. Erzurumlu, and E.M. Powell, *Insulin-Independent GABAA Receptor-Mediated Response in the Barrel Cortex of Mice with Impaired Met Activity*. J Neurosci, 2016. **36**(13): p. 3691-7.
54. Samanta, D., *Surendra Nath Sehgal: A pioneer in rapamycin discovery*. Indian J Cancer, 2017. **54**(4): p. 697-698.
55. Sabatini, D.M., et al., *RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs*. Cell, 1994. **78**(1): p. 35-43.
56. *rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein*. 1994. p. 16333-16339.
57. *Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function*. 2006. p. 869-880.
58. *MTORC1: Turning off is just as important as turning on*. 2014. p. 627-628.
59. Demetriades, C., M. Plescher, and A.A. Teleman, *Lysosomal recruitment of TSC2 is a universal response to cellular stress*. Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 10662.
60. Sabatini, D.M., et al., *Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1161-4.
61. <Dissertation Jennifer Wuchter geb. Metzger.pdf>.
62. Tyagarajan, S.K., et al., *Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 379-84.
63. Tyagarajan, S.K., et al., *Extracellular signal-regulated kinase and glycogen synthase kinase 3 β regulate gephyrin postsynaptic aggregation and GABAergic synaptic function in a calpain-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2013. **288**(14): p. 9634-47.
64. Dunn, K.W., T.E. McGraw, and F.R. Maxfield, *Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 2): p. 3303-14.
65. Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick, *Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 11821-7.
66. Jovic, M., et al., *The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads*. Histol Histopathol, 2010. **25**(1): p. 99-112.
67. Nagano, M., et al., *Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network*. Communications Biology, 2019. **2**(1): p. 419.
68. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. Embo j, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
69. Tang, S., et al., *Altered Forebrain Functional Connectivity and Neurotransmission in a Kinase-Inactive Met Mouse Model of Autism*. Mol Imaging, 2019. **18**: p. 1536012118821034.
70. Zeigerer, A., et al., *Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 465-70.
71. Bae, M.H., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF) modulates GABAergic inhibition and seizure susceptibility*. Exp Neurol, 2010. **221**(1): p. 129-35.
72. Chen, A.I., et al., *TrkB (tropomyosin-related kinase B) controls the assembly and maintenance of GABAergic synapses in the cerebellar cortex*. J Neurosci, 2011. **31**(8): p. 2769-80.
73. Penn, Y., M. Segal, and E. Moses, *Network synchronization in hippocampal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(12): p. 3341-6.
74. Kim, Y.G. and Y.I. Lee, *Differential Expressions of Synaptogenic Markers between Primary Cultured Cortical and Hippocampal Neurons*. Exp Neurobiol, 2012. **21**(2): p. 61-7.
75. Chen, K., et al., *Time-delimited signaling of MET receptor tyrosine kinase regulates cortical circuit development and critical period plasticity*. Mol Psychiatry, 2020.

76. Peng, Y., et al., *The autism-associated MET receptor tyrosine kinase engages early neuronal growth mechanism and controls glutamatergic circuits development in the forebrain*. Mol Psychiatry, 2016. **21**(7): p. 925-35.
77. Heun-Johnson, H. and P. Levitt, *Differential impact of Met receptor gene interaction with early-life stress on neuronal morphology and behavior in mice*. Neurobiol Stress, 2018. **8**: p. 10-20.
78. Qiu, S., Z. Lu, and P. Levitt, *MET receptor tyrosine kinase controls dendritic complexity, spine morphogenesis, and glutamatergic synapse maturation in the hippocampus*. J Neurosci, 2014. **34**(49): p. 16166-79.
79. Qiu, S., Z. Lu, and P. Levitt, *MET Receptor Tyrosine Kinase Controls Dendritic Complexity, Spine Morphogenesis, and Glutamatergic Synapse Maturation in the Hippocampus*. The Journal of Neuroscience, 2014. **34**(49): p. 16166-16179.
80. Alkadhi, K.A., *Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus*. Molecular Neurobiology, 2019. **56**(9): p. 6566-6580.
81. Frahm, C. and A. Draguhn, *GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus*. Developmental Brain Research, 2001. **132**(1): p. 1-13.
82. Arima-Yoshida, F., A.M. Watabe, and T. Manabe, *The mechanisms of the strong inhibitory modulation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(9): p. 1637-46.
83. Rubenstein, J.L. and M.M. Merzenich, *Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems*. Genes Brain Behav, 2003. **2**(5): p. 255-67.
84. Hussman, J.P., *Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism*. J Autism Dev Disord, 2001. **31**(2): p. 247-8.
85. Hedrick, A., et al., *Autism risk gene MET variation and cortical thickness in typically developing children and adolescents*. Autism Res, 2012. **5**(6): p. 434-9.
86. Smith, J.M., J. Xu, and E.M. Powell, *Age dependent forebrain structural changes in mice deficient in the autism associated gene Met tyrosine kinase*. Neurolmage: Clinical, 2012. **1**(1): p. 66-74.
87. Campbell, D.B., et al., *A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16834-9.
88. Eagleson, K.L., Z. Xie, and P. Levitt, *The Pleiotropic MET Receptor Network: Circuit Development and the Neural-Medical Interface of Autism*. Biol Psychiatry, 2017. **81**(5): p. 424-433.
89. Weston, M.C., H. Chen, and J.W. Swann, *Multiple roles for mammalian target of rapamycin signaling in both glutamatergic and GABAergic synaptic transmission*. J Neurosci, 2012. **32**(33): p. 11441-52.
90. Moumen, A., et al., *Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development*. Development, 2007. **134**(7): p. 1443-51.
91. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *Rheb fills a GAP between TSC and TOR*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(11): p. 573-6.
92. Beausoleil, S.A., et al., *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(33): p. 12130-12135.
93. Saito, A., et al., *Neuroprotective Role of a Proline-Rich Akt Substrate in Apoptotic Neuronal Cell Death after Stroke: Relationships with Nerve Growth Factor*. The Journal of Neuroscience, 2004. **24**(7): p. 1584-1593.
94. Shimaya, A., K.S. Kovacina, and R.A. Roth, *On the mechanism for neomycin reversal of wortmannin inhibition of insulin stimulation of glucose uptake*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55277-82.
95. Nascimento, E.B.M., et al., *Insulin-Mediated Phosphorylation of the Proline-Rich Akt Substrate PRAS40 Is Impaired in Insulin Target Tissues of High-Fat Diet-Fed Rats*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3221-3228.
96. Sancak, Y., et al., *PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase*. Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 903-15.

97. Haar, E.V., et al., *Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(3): p. 316-323.
98. von der Brélie, C., et al., *Impaired synaptic plasticity in a rat model of tuberous sclerosis*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(3): p. 686-92.
99. Tavazoie, S.F., et al., *Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2*. Nature Neuroscience, 2005. **8**(12): p. 1727-1734.
100. Goorden, S.M.I., et al., *Cognitive deficits in Tsc1+/-mice in the absence of cerebral lesions and seizures*. Annals of Neurology, 2007. **62**(6): p. 648-655.
101. Yasuda, S., et al., *Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 5155.
102. Guang, S., et al., *Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 470.
103. Kelleher, R.J., 3rd, et al., *High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35003.
104. Normand, E.A., et al., *Temporal and mosaic Tsc1 deletion in the developing thalamus disrupts thalamocortical circuitry, neural function, and behavior*. Neuron, 2013. **78**(5): p. 895-909.
105. Meikle, L., et al., *Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function*. J Neurosci, 2008. **28**(21): p. 5422-32.
106. Talos, D.M., et al., *Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIb cortical dysplasia*. Ann Neurol, 2012. **71**(4): p. 539-51.
107. Salussolia, C.L., et al., *Genetic Etiologies, Diagnosis, and Treatment of Tuberous Sclerosis Complex*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2019. **20**: p. 217-240.
108. Treiman, D.M., *GABAergic mechanisms in epilepsy*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 3**: p. 8-12.
109. Tsai, P.T., et al., *Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice*. Nature, 2012. **488**(7413): p. 647-51.
110. Leung, A.K. and W.L. Robson, *Tuberous sclerosis complex: a review*. J Pediatr Health Care, 2007. **21**(2): p. 108-14.
111. Alsaqati, M., V.M. Heine, and A.J. Harwood, *Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation*. Mol Autism, 2020. **11**(1): p. 80.
112. Li, N., K.S. Hill, and L.A. Elferink, *Analysis of receptor tyrosine kinase internalization using flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2008. **457**: p. 305-17.
113. Avruch, J., et al., *Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase*. Oncogene, 2006. **25**(48): p. 6361-72.
114. Kroemer, G., G. Mariño, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 280-93.
115. Kim, E., et al., *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(8): p. 935-45.
116. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. Science, 2008. **320**(5882): p. 1496-501.
117. Dibble, C.C. and L. Cantley. *The primary pathway from PI 3 K to mTORC 1 : switching on Rheb*. 2016.
118. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
119. Buerger, C., B. DeVries, and V. Stambolic, *Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 869-80.
120. Flinn, R.J., et al., *The late endosome is essential for mTORC1 signaling*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(5): p. 833-41.
121. Stenmark, H., et al., *Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis*. Embo j, 1994. **13**(6): p. 1287-96.
122. Mohrmann, K., et al., *Rab4 function in membrane recycling from early endosomes depends on a membrane to cytoplasm cycle*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32029-35.

123. Zhang, M., et al., *Rab7: roles in membrane trafficking and disease*. Biosci Rep, 2009. **29**(3): p. 193-209.
124. Huber, L.A., et al., *Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane*. J Cell Biol, 1993. **123**(1): p. 35-45.
125. Bhui, T. and J.K. Roy, *Rab11 in disease progression*. Int J Mol Cell Med, 2015. **4**(1): p. 1-8.
126. Menon, S., et al., *Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome*. Cell, 2014. **156**(4): p. 771-85.
127. Papadopoulos, T., et al., *Endosomal Phosphatidylinositol 3-Phosphate Promotes Gephyrin Clustering and GABAergic Neurotransmission at Inhibitory Postsynapses*. J Biol Chem, 2017. **292**(4): p. 1160-1177.
128. Jaber, N., et al., *Vps34 regulates Rab7 and late endocytic trafficking through recruitment of the GTPase-activating protein Armus*. J Cell Sci, 2016. **129**(23): p. 4424-4435.
129. Law, F. and C.E. Rocheleau, *Vps34 and the Armus/TBC-2 Rab GAPs: Putting the brakes on the endosomal Rab5 and Rab7 GTPases*. Cell Logist, 2017. **7**(4): p. e1403530.
130. Brown, T.C., et al., *NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD*. Neuron, 2005. **45**(1): p. 81-94.
131. Yap, C.C. and B. Winckler, *Harnessing the power of the endosome to regulate neural development*. Neuron, 2012. **74**(3): p. 440-51.
132. Pescosolido, M.F., et al., *Lighting a path: genetic studies pinpoint neurodevelopmental mechanisms in autism and related disorders*. Dialogues Clin Neurosci, 2012. **14**(3): p. 239-52.
133. Xiao, G.H., et al., *The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6097-100.
134. García-Peñas, J.J., *[Autism, epilepsy and temporal lobe pathology]*. Rev Neurol, 2009. **48 Suppl 2**: p. S35-45.
135. Becker, A.J., et al., *Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in gangliogliomas*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2001. **27**(2): p. 105-14.
136. Beck, H., et al., *Synaptic plasticity in the human dentate gyrus*. J Neurosci, 2000. **20**(18): p. 7080-6.