

**Molekulare Mechanismen der Gehirnfunktion bei
mTOR-defizienten genetischen Syndromen mit
kognitiven Störungen**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

eingereicht am Fachbereich für Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

M. Sc. Annabelle Arlt

geboren am 08.08.1984 in Siegen

Mainz, 2018

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	II
II Zusammenfassung.....	VI
III Abstract	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Die mTOR-Signalkaskade	1
1.2 mTOR als treibende Kraft der GluA1-Translation und Voraussetzung für LTP und LTD	3
1.3 mTOR-vermittelte Fehlregulation der Proteintranslation bei Syndromen mit Intelligenzminderung und Autismus	5
1.3.1 Tuberoöse Sklerose (TS)	7
1.3.2 <i>Tsc</i> -Tiermodelle	9
1.4 mTOR als Schlüsselfunktion während der Gedächtniskonsolidierung	11
1.4.1 <i>Immediate-early genes</i> (IEGs)	19
1.5 mTOR als ein Regulator bei chronisch-sozialem Stress (CSS)	20
1.6 Fragestellung und Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.3 Vorgefertigte Systeme (Kits).....	25
2.1.4 Längenstandards und Ladepuffer	25
2.1.5 Enzyme	26
2.1.6 Primäre Antikörper	26
2.1.7 Sekundäre Antikörper.....	26
2.1.8 Primer	27
2.1.8.1 Primer für Genotypisierungen	27
2.1.8.2 Primer für die RT-qPCR	27
2.1.9 Biologisches Material	28
2.1.9.1 Mauslinien	28
2.1.9.2 Basisdaten der für die Verhaltensversuche verwendeten Mäuse.....	29
2.1.9.3 Basisdaten der verwendeten murinen Gehirne	37

2.1.10	Software und Datenanalyse	40
2.1.11	EDV-Programme	40
2.1.12	Statistik	41
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Verhaltensstudien mit <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen.....	42
2.2.1.1	Sozialverhalten.....	42
2.2.1.1.1	<i>Social Interaction</i> (SI).....	42
2.2.1.1.2	<i>Nest Building</i> (NB).....	44
2.2.1.2	Angstverhalten	45
2.2.1.2.1	<i>Elevated Plus Maze</i> (EPM)	45
2.2.1.3	Testung der kognitiven Leistung	46
2.2.1.3.1	<i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM).....	46
2.2.1.3.2	<i>Morris Water Maze</i> (MWM).....	47
2.2.1.3.3	<i>24 Hours Novel Object Recognition Task</i> (24 h NORT).....	49
2.2.1.3.4	<i>Seven Days Novel Object Recognition Task</i> (7 d NORT).....	51
2.2.1.3.5	Verhaltensexperimente für Expressionsstudien	52
2.2.1.4	<i>Tail Suspension</i> (TS).....	52
2.2.1.5	Sensorische Funktion	53
2.2.1.5.1	<i>Prepulse Inhibition</i> (PPI)	53
2.2.1.6	Chronisch-sozialer Stress (CSS).....	53
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	55
2.2.2.1	Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	55
2.2.2.2	Standard-PCR	55
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	58
2.2.2.4	Isolation genomischer RNA aus Gehirngewebe	58
2.2.2.5	Reverse Transkription.....	59
2.2.2.6	RT-qPCR	60
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	62
2.2.3.1	Proteinlysatherstellung.....	62
2.2.3.2	SDS-PAGE	62
2.2.3.3	Western Blots.....	64
3.	Ergebnisse.....	65
3.1	Verhaltensexperimente mit <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen	65
3.1.1	Sozialverhalten	65

3.1.1.1	<i>Social Interaction</i> (SI)	65
3.1.1.2	<i>Nest Building</i> (NB)	66
3.1.2	Angstverhalten	69
3.1.2.1	<i>Elevated Plus Maze</i> (EPM)	69
3.1.3	Testung der kognitiven Leistung	71
3.1.3.1	<i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM)	71
3.1.3.2	<i>Morris Water Maze</i> (MWM)	72
3.1.3.3	<i>24 Hours Novel Object Recognition Task</i> (24 h NORT)	77
3.1.3.4	<i>Seven Days Novel Object Recognition Task</i> (7 d NORT)	79
3.2	Verhaltensexperimente mit <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäusen nach chronisch-sozialem Stress (CSS).	81
3.2.1	Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	81
3.2.1.1	<i>Social Interaction</i> (SI)	81
3.2.1.2	<i>Nest Building</i> (NB)	83
3.2.2	Angstverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	84
3.2.2.1	<i>Elevated Plus Maze</i> (EPM)	84
3.2.3	Kognitive Leistung nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	85
3.2.3.1	<i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM)	85
3.2.4	Sensorische Funktion nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	87
3.2.4.1	<i>Prepulse Inhibition</i> (PPI)	87
3.2.5	<i>Tail Suspension</i> (TS) nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	89
3.3	Proteinnetzwerkanalysen von <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen.	91
3.4	Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen von acht bis neun Monate alten <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäusen	101
4.	Diskussion	103
4.1	Verhaltensexperimente mit <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen.....	103
4.1.1	Vier Monate alte <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Männchen zeigen autistische Verhaltensmuster	103
4.1.2	<i>Tsc2</i> ^{+/-} -Männchen zeigen in unterschiedlichen Altersgruppen keine Beeinträchtigungen im Hippocampus-abhängigen Lernen	104
4.1.2.1	<i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mausmodelle und die Kontroversen der Literatur	105

4.1.3	Acht Monate alte <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Männchen zeigen eine defizitäre Gedächtniskonsolidierung	106
4.2	Verhaltensexperimente mit vier Monate alten <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäusen nach chronisch-sozialem Stress (CSS)	109
4.3	Der heterozygote <i>knockout</i> von <i>Tsc2</i> verursacht erste pathologische Veränderungen während der sehr frühen Gehirnentwicklung der <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäuse.....	112
4.4	Zwei bis acht Monate alte <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäuse zeigen eine Akkumulation von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in hippocampalen und cortikalen Gehirnregionen..	116
4.5	Acht bis neun Monate alte <i>Tsc2</i>^{+/-}-Mäuse zeigen eine reduzierte Expression von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen ...	116
5.	Literaturverzeichnis.....	120
6.	Anhang	135
6.1	Abkürzungsverzeichnis	135
6.2	Abbildungsverzeichnis	140
6.3	Tabellenverzeichnis	142
6.4	Konferenzbeiträge	143
6.5	Eidesstattliche Erklärung	144

II Zusammenfassung

Tuberöse Sklerose (TS) ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die durch Mutationen in dem *TSC1*- oder *TSC2*-Gen verursacht wird. Mutationen in diesen Genen führen zu einer erhöhten Aktivität des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalwegs und in Folge zu einer Hochregulierung der *downstream*-Signalkaskade. Der mTOR-Signalweg ist ein wichtiger Regulator der lokalen Proteintranslation im postsynaptischen Kompartiment des Gehirns und steuert die Synthese von Proteinen, die an der synaptischen Plastizität beteiligt sind. Weiterhin wird die mTOR-Signalkaskade in Zusammenhang mit Stressverarbeitung und mentaler Resilienz diskutiert. Intelligenzminderung, Autismus, Epilepsie und gutartige Tumore in verschiedenen Organsystemen sind charakteristische Merkmale der TS. Über die molekularen Mechanismen, die dem mentalen Erscheinungsbild zugrunde liegen, ist noch wenig bekannt.

Um zunächst die Entwicklung neurologischer Symptome von TS zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit das konstitutive, heterozygote *Tsc2 knockout* Mausmodell verwendet, welches die Heterozygotie der *TSC2*-Mutationen von TS-Patienten simuliert. Der Hypothese zufolge, dass die Entwicklung der neurologischen Symptome ein gradueller, progressiver Prozess ist, wurden die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse in unterschiedlichen Altersgruppen untersucht und in Verhaltensbatterien analysiert, die zum einen Fähigkeiten des Sozialverhaltens und zum anderen kognitive Leistungen messen. Darüber hinaus durchliefen die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse verschiedene Verhaltenstests, nachdem sie chronisch-sozialem Stress (CSS) ausgesetzt wurden.

Die in dieser Dissertation erlangten Daten zeigen, dass *Tsc2*^{+/-}-Mäuse (i) autistische Verhaltensmuster und kognitive Defizite schrittweise entwickeln und, dass (ii) den kognitiven Defiziten eine defizitäre Gedächtniskonsolidierung zugrunde liegt. Weiterhin wurde gezeigt, dass (iii) CSS den *Tsc2*^{+/-}-Phänotypen beeinflusst.

Vorangegangene Versuche, die über elektrophysiologische und proteinanalytische Methoden erlangt wurden, geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der sich schrittweise entwickelnde TS-Phänotyp aus ersten neuronalen Veränderungen während der sehr frühen Gehirnentwicklung resultieren könnte, die sich über die Zeit summieren und sich zunehmend pathologisch auf neuronale Netzwerke auswirken.

Um die biochemischen Mechanismen der betroffenen Gehirnregionen von älteren *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Proteinanalysen der mTOR-Signalkaskade und Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen *immediate early genes* (IEGs) durchgeführt. Die Resultate zeigen sowohl eine (i) Kompensation als auch eine (ii)

Akkumulation von Proteinen des mTOR-Signalwegs sowie eine (iii) reduzierte Expression von IEGs in Gehirnregionen, die in die Gedächtniskonsolidierung involviert sind, und schaffen somit eine Grundlage, um die späte Entwicklung der autistischen Verhaltensmuster und auch die sehr spät eintretende defizitäre Gedächtniskonsolidierung der *Tsc2*^{+/-}-Mauslinie zu erklären.

Die erlangten Ergebnisse stellen die bislang veröffentlichten Daten zum Teil in Frage und eröffnen neue Perspektiven für translationale Forschungsansätze. In weiterführenden Studien werden die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse in einem sehr frühen Entwicklungsstadium mit dem Wirkstoff Vigabatrin behandelt, der die Aktivität der mTOR-Signalkaskade hemmt. Die behandelten Versuchsmäuse und deren Kontrolltiere sollen erneut in unterschiedlichen Altersgruppen in ihrem Verhalten getestet werden. Weiterhin sollen die Auswirkungen von *early life stress* auf das *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell untersucht und die molekularen Mechanismen der Auswirkungen von CSS auf ältere *Tsc2*^{+/-}-Mäuse analysiert werden. Darüber hinaus sind nicht nur projektionsanalytische Verfahren mit älteren *Tsc2*^{+/-}-Mäuse geplant, sondern es sollen auch spezifische Verhaltenstests und funktionelle Magnetresonanztomographien bei Kindern mit TS durchgeführt werden, um die Defizite in der Gedächtniskonsolidierung näher zu charakterisieren und die hippocampalen-cortikalen Projektionen zu analysieren.

III Abstract

Tuberous Sclerosis (TS) is an autosomal dominant genetic disease caused by mutations in either the *TSC1* or the *TSC2* gene. Mutations are thought to result in an increase of mechanistic target of rapamycin (mTOR) activity and an upregulation of downstream signaling. The mTOR kinase is the most important regulator of local protein translation in the postsynaptic compartment in the brain and controls the synthesis of several proteins involved in synaptic function and plasticity. The mTOR pathway is also supposed to be a key player in stress reaction and mental resilience. Intellectual disability (ID), autism, epilepsy and benign tumors in several organic systems are characteristic features of TS. However, not much is known about the neurophysiological mechanisms underlying ID and autism in TS patients. To investigate the development and mechanisms of neurological symptoms in TS, a heterozygous *Tsc2* knockout mouse model was used that resembles the heterozygosity of *TSC2* mutations in TS patients.

Following the hypothesis, that the development of TS is a gradual, progressive process, heterozygous *Tsc2* knockout mice of different ages were analyzed in a behavior battery measuring different domains of cognition and social behavior. Furthermore, *Tsc2*^{+/-} mice went through different behavior tests after a chronic social defeat paradigm.

The behavior data of this work show that autistic features and ID in TS (i) develops over time, that (ii) ID is caused by deficits in memory consolidation and that (iii) chronic social defeat influences the phenotype of *Tsc2*^{+/-} mice. Previous electrophysiological studies and protein analysis demonstrate a clear evidence that the late TS phenotype results from the number of very early changes in neurodevelopment which accumulate with time and cause subtle pathology in neuronal networks. In order to get a deeper insight into the biochemical mechanisms and affected brain regions of older *Tsc2*^{+/-} mice, protein expression analysis and expression studies of activity-dependent immediate early genes (IEGs) were performed. The results show (i) a compensatory effect as well as (ii) an accumulation of mTOR pathway proteins with time and (iii) a decreased expression of IEG's in brain regions involved in memory consolidation. These results pave the way to an understanding of the development of late-onset autistic features and the very late onset of deficits in memory consolidation in the heterozygous *Tsc2* knockout mouse model.

With this data in mind, *Tsc2*^{+/-} mice will be treated with the mTOR pathway inhibitor Vigabatrin in very early stages of brain development and will be tested in social interaction and cognition tests.

Furthermore, the effects of early life stress on the *Tsc2*^{+/-} mouse model will be investigated and the molecular mechanisms of the impact of chronic social defeat on older *Tsc2*^{+/-} mice will be analyzed. Besides projection analysis in older *Tsc2*^{+/-} mice, specific behavioral testing and functional magnetic resonance imaging will be performed in TS children to further characterize the deficits in memory consolidation and to specifically analyze the hippocampal-cortical projections.

1. Einleitung

1.1 Die mTOR-Signalkaskade

mTOR ist eine konservierte, 259 Kilodalton (kDa) schwere Serin-/Threoninkinase, die ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert ist (Kim et al., 2002; Sabatini et al., 1999). In Säugetierzellen ist mTOR mit den Proteinen mTOR complex 1 (mTORC1) und mTOR complex 2 (mTORC2) assoziiert (Abbildung (Abb.) 1.1) (Bockaert and Marin, 2015). Dabei kontrollieren mTORC1 und mTORC2 Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, die für wichtige zelluläre Prozesse, wie das Zellwachstum, die Zellgröße, die Apoptose und die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts von Bedeutung sind. Zudem ist der mTOR-Signalweg ein Sensor für wichtige Nährstoffe, wie zum Beispiel Glukose, Lipide, Aminosäuren, Sauerstoff und Adenosintriphosphat (ATP) (Laplante and Sabatini, 2012). Weiterhin phosphoryliert mTORC1 die Proteinsyntheseregulatoren 4E-BP1 und S6K1/2, die in Folge eine Kaskade von weiteren Schlüsselproteinen phosphorylieren und somit die *messenger ribonucleic acid* (mRNA)-Translation beziehungsweise die Proteinsynthese regulieren (Ma and Blenis, 2009). Die mTORC1-Signalkaskade stellt eine therapeutische Relevanz dar, weil dieser Komplex über das Immunsuppressivum Rapamycin (Fattori and Piva, 2003) gehemmt werden kann. Dabei bildet der Wirkstoff mit dem intrazellulären Rezeptor *FK-binding protein 12* (FKBP12) einen Inhibitionskomplex, der an den C-Terminus des TOR-Proteins bindet und die mTOR-Aktivität inhibiert (Garza-Lombo and Gonsebatt, 2016; Wang and Proud, 2006).

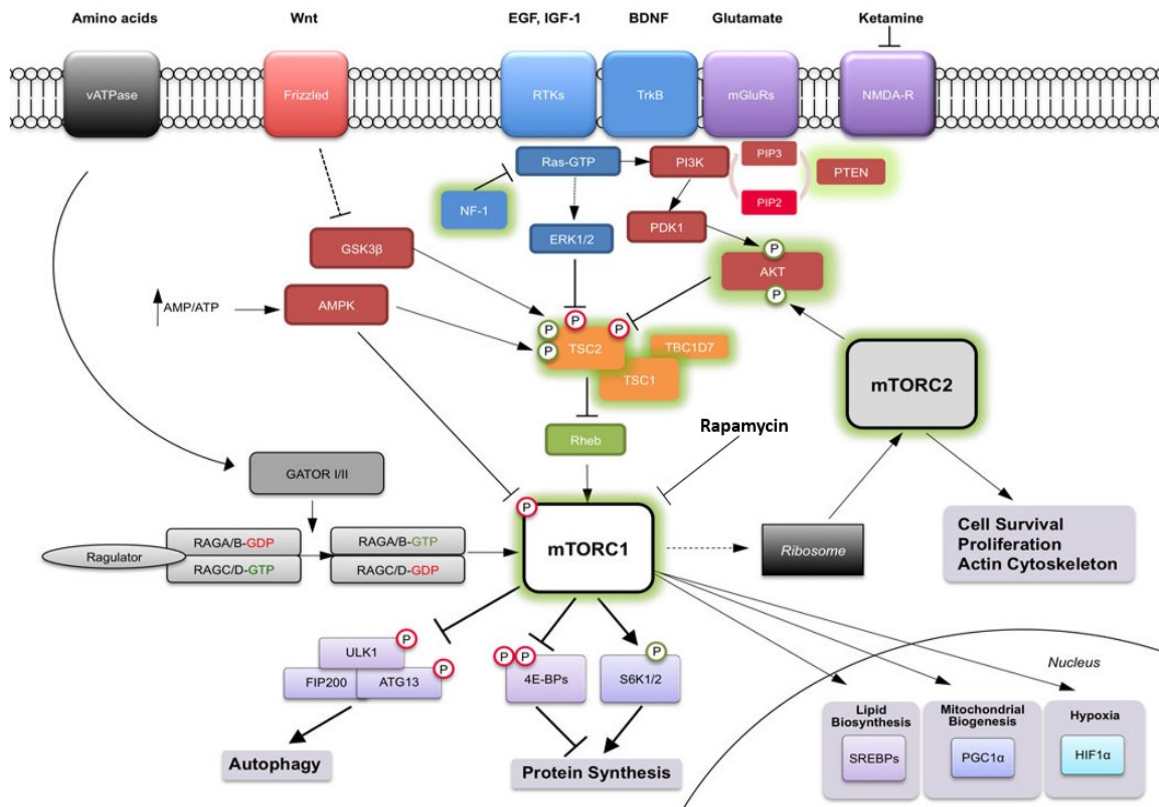


Abbildung 1.1: Modell der mTOR-Signalkaskade.

Die mTOR-Kinase ist ein Multiproteinkomplex aus mTORC1 und mTORC2. Die mTOR-Komplexe regulieren Wachstumsfaktoren, integrieren Signale von Zytokinen und Nährstoffen und regulieren verschiedene intrazelluläre Einflüsse, um eine Vielzahl wichtiger zellulärer Reaktionen hervorzurufen. Während es tausende mTOR-Substrate gibt, werden nur diejenigen dargestellt, die am besten bei der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Proteinsynthese und der Autophagie charakterisiert wurden (modifiziert nach Lipton and Sahin, 2014).

1.2 mTOR als treibende Kraft der GluA1-Translation und Voraussetzung für LTP und LTD

In Neuronen ist die mTOR-vermittelte, lokale Proteinsynthese in Zellausläufern wie Dendriten, dendritischen Fortsätzen (Abb. 1.2), Axonen und Synapsen die Voraussetzung für neuronale Entwicklung und synaptische Plastizität und somit für Lernen und Gedächtnis. Die synaptische Plastizität ist ein laufender Prozess bei dem die synaptische Übertragung als Reaktion auf spezifische Aktivitätsmuster entweder gestärkt oder geschwächt werden kann (zusammengefasst in Henley and Wilkinson, 2016). Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) (zusammengefasst in Henley and Wilkinson, 2016) sind Formen der synaptischen Plastizität, die als elektrophysiologische Grundlagen von Lernprozessen und Gedächtnisbildung betrachtet werden können und ohne mTOR-gesteuerte Proteinsynthese nicht möglich wären. LTP ist definiert als eine langanhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung, die hauptsächlich auf eine erhöhte Anzahl von postsynaptischen *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors* (AMPA-Rezeptoren) zurückzuführen ist. LTD ist eine langanhaltende Abnahme der synaptischen Stärke, basierend auf einer verringerten Anzahl der postsynaptischen AMPA-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren sind ionotrope, also Ionenkanal-bildende Glutamaterezeptoren. Es existieren vier AMPA-Rezeptor-Untereinheiten die als GluA1, GluA2, GluA3 und GluA4 bezeichnet werden (zusammengefasst in Henley and Wilkinson, 2016). GluA2 ist für Calcium nicht permeabel. GluA1, GluA3 und GluA4 sind hingegen Calcium-permeable Untereinheiten. GluA1 ist notwendig für eine Initiation von LTP, da diese Untereinheit für die aktivitätsabhängige Rekrutierung der AMPA-Rezeptoren an die postsynaptische Membran verantwortlich ist (zusammengefasst in Hayashi et al., 2000). Hierfür aktiviert der Wachstumsfaktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) über die *calcium calmodulin-dependent protein kinase kinase* (CaMKK) oder die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) die mTOR-Signalkaskade, die in Folge die GluA1-Translation stimuliert (Fortin et al., 2012). Die Rekrutierung der AMPA-Rezeptoren an die Postsynapse wird durch eine Phosphorylierung von GluA1 durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und die Interaktion mit synaptischen *PSD95-disc large-zonula occludens-1* (PDZ)-Domäne-haltigen Proteinen, wie zum Beispiel dem *postsynaptic density protein 95* (PSD95) vermittelt (Hanley, 2008; Hayashi et al., 2000; Zamanillo et al., 1999). PSD95 ist ein postsynaptischer Regulator, der die AMPA-Rezeptoren in der Zellmembran mit dem Zytoskelett verbindet (MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013). Sobald die GluA1-vermittelte Zunahme der AMPA-Rezeptoren

an der postsynaptischen Membran etabliert ist, vermittelt eine Dephosphorylierung von GluA1 wiederum deren Abbau. Wechselwirkungen mit der Calcium undurchlässigen GluA2-Untereinheit übernehmen in Folge die Kontrolle der aktivitätsabhängigen AMPA-Rezeptor-Endozytose und LTD wird induziert (Henley and Wilkinson, 2016; Lee et al., 2004; Shi et al., 2001).

Bei einer normalen synaptischen Übertragung aktiviert der Neurotransmitter Glutamat die AMPA-Rezeptoren, während die *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, welche ebenfalls zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gezählt werden, durch ein extrazelluläres Magnesium-Molekül blockiert sind (Bliss and Collingridge, 1993). Erfolgt eine wiederholte Erregung der postsynaptischen Membran durch Glutamat, ausgelöst durch eine hohe Frequenz an Aktionspotentialen, kommt es bedingt durch die Rekrutierung von weiteren AMPA-Rezeptoren und einer längeren Öffnung der AMPA-Kanäle, zu einem erhöhten Influx von Calcium- und auch Natrium-Ionen. In Folge wird die postsynaptische Membran depolarisiert und der positiv geladene Magnesium-Block der NMDA-Rezeptoren wird gelöst, was zu einem zusätzlichen Einstrom von Calcium und Natrium führt. Dies induziert LTP (Burnashev et al., 1995; Harvey and Shahid, 2012; Nowak et al., 1984). Die deutlich erhöhte Calciumkonzentration aktiviert die enzyminduzierte Freisetzung des gasförmigen Stickstoffmonoxids (NO). NO wirkt als retrograder Botenstoff auf die präsynaptische Zelle und sorgt dort für die Aufrechterhaltung der Glutamatausschüttung und hält somit den erhöhten Einstrom von Calcium in die postsynaptische Zelle konstant (Bohme et al., 1991; Hawkins et al., 1998; Huang, 1997). Auf diese Weise bleibt die Postsynapse, also der Bereich einer Nervenzelle der Signale empfängt, über Stunden oder Tage erregt, was bei Lernvorgängen und für die Gedächtnisbildung essentiell ist.

1.3 mTOR-vermittelte Fehlregulation der Proteintranslation bei Syndromen mit Intelligenzminderung und Autismus

In der Literatur sind zahlreiche genetische Erkrankungen beschrieben, die bedingt durch eine Fehlregulation der mTOR-vermittelten Proteintranslation strukturelle Anomalien der dendritischen Fortsätze und einer daraus resultierenden Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität, einschließlich der LTP und der LTD aufzeigen (zusammengefasst in Troca-Marin et al., 2012). Dendritische Fortsätze (Abb. 1.2) sind postsynaptische Elemente von erregenden, also auch von glutamatergen Synapsen im zentralen Nervensystem (vergleiche 1.2). Diese hochdynamischen Strukturen wechseln in Abhängigkeit von der synaptischen Stärke ihre Struktur, Größe und Form und variieren in der Anzahl (Caroni et al., 2012; Tada and Sheng, 2006; Yuste and Bonhoeffer, 2001).

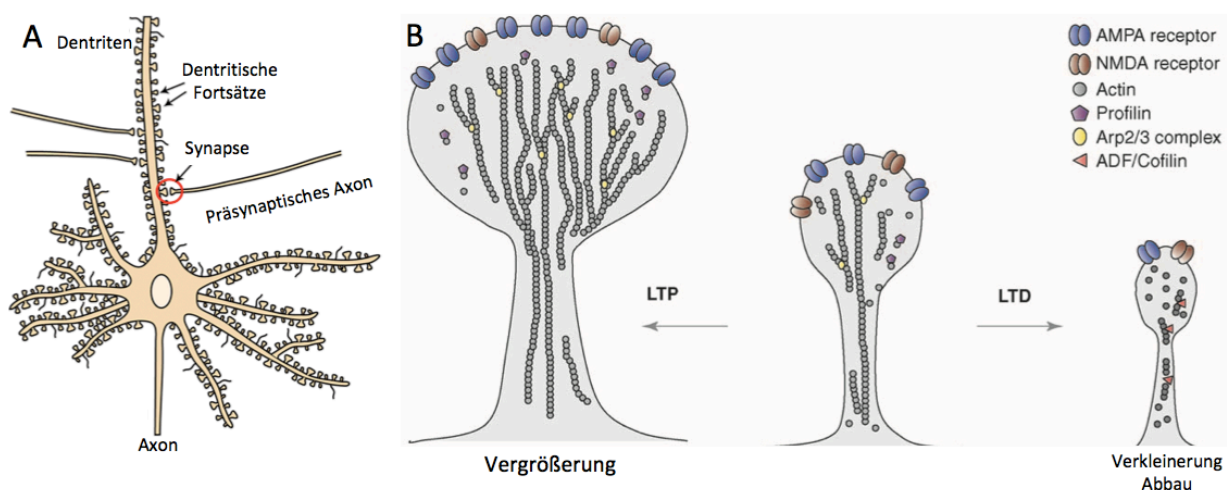


Abbildung 1.2: Eine Fehlregulation der mTOR-vermittelten Proteintranslation führt zu Anomalien der dendritischen Fortsätze.

- A) Ein Neuron besteht typischerweise aus einem Axon, einem Perikaryon (Zellkörper) und mehreren Dendriten, welche zahlreiche Fortsätze tragen, die in Kontakt mit anderen Neuronen stehen und somit eine Synapse bilden (verändert nach Smrt and Zhao, 2010).
- B) Dendritische Fortsätze sind hochdynamische, postsynaptische Elemente von erregenden Synapsen. In Korrelation mit der synaptischen Stärke, also in Abhängigkeit von der AMPA-Rezeptoren-Anzahl verändern diese Strukturen ihre Struktur, Größe und Form und variieren in der Anzahl (verändert nach Tada and Sheng, 2006).

Es gibt einen Formenkreis von Erkrankungen bei denen die mTOR-Kinase überaktiv oder in ihrer Aktivität behindert ist. Zu den Syndromen mit einer erhöhten mTOR-Aktivität zählt die TS (bedingt durch Mutationen in den Genen *TSC1* oder *TSC2*), das Fragile-X-Syndrom (bedingt durch Mutationen in dem *FMRI*-Gen) und auch das Down's Syndrom (Trisomie von Chromosom 21). Darüber hinaus gibt es Erkrankungen bei denen die mTOR-Aktivität erniedrigt ist. Erwähnenswert ist an dieser Stelle das Opitz G/BBB-Syndrom (bedingt durch Mutationen in dem *MIDI*-Gen) und das Rett-Syndrom (bedingt durch Mutationen in den Genen *MECP2* oder *CDKL5*). Die meisten Patienten mit überaktiver oder beeinträchtigter mTOR-Kinase zeigen Defizite im Lernverhalten oder sogar eine manifeste Intelligenzminderung (Intelligenzquotient (IQ) < 70) (Liu et al., 2011; Troca-Marin et al., 2012). Weiterhin können Patienten sowohl Epilepsie als auch autistische Züge oder eine Autismus-Spektrum-Störung entwickeln. Es wird angenommen, dass diese beiden Symptome aufgrund von einer gestörten neuronalen Erregbarkeit entstehen, was zu einer Verschiebung des exzitatorischen/inhibitorischen (E/I)-Gleichgewichts, also zu einem Ungleichgewicht zwischen erregenden und hemmenden Neurotransmittern der Nervenzelle führt und ebenfalls der abnormen synaptischen Plastizität in der frühen Gehirnentwicklung zu Grunde liegt (Brooks-Kayal, 2010; Foss-Feig et al., 2017; Spooren et al., 2012; Takarae and Sweeney, 2017; Troca-Marin et al., 2012).

1.3.1 Tuberöse Sklerose (TS)

Die vorliegende Doktorarbeit ist im Wesentlichen fokussiert auf Verhaltensanalysen und molekulare Mechanismen der Gehirnfunktion bei der TS. TS ist eine Multisystemerkrankung, die mit einer Prävalenz von 1:8000 in der Bevölkerung auftritt (Kristof et al., 2015). Patienten leiden unter einer lebenslangen Erkrankung mit zahlreichen Manifestationen. Hierzu zählen Gehirntumore und -fehlbildungen und meist gutartige Tumore, die sich im Herzen, in der Niere, in den Augen und auf der Haut entwickeln können (Crino et al., 2006). Bei mehr als 90 % der Betroffenen zeigen sich zudem neurologische Symptome (Jeste et al., 2008). Die überwiegende Mehrheit der Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten entwickeln epileptische Anfälle (Holmes and Stafstrom, 2007), die bei 69 % bereits im ersten Lebensjahr und nur bei 4 % erst nach dem 16. Lebensjahr auftreten (Webb et al., 1996). Weiterhin entwickeln etwa 44 bis 60 % der betroffenen Kinder schon frühkindlich eine Intelligenzminderung (Humphrey et al., 2004; Jeste et al., 2008; Smalley et al., 1992). TS-Patienten mit einem normalen IQ haben dennoch Defizite im Langzeit- und Arbeitsgedächtnis (Ridler et al., 2007). Weiterhin zeigen 25 bis 50 % der Betroffenen autistische Züge oder erfüllen die Kriterien für eine Autismus-Spektrum-Störung (Bolton and Griffiths, 1997; Bolton et al., 2002; Holmes and Stafstrom, 2007). Jeste et al. (2014) beschrieben, dass sich Autismus in TS-Patienten bereits zwischen dem ersten und fünften Lebensjahr entwickeln kann. Wobei das Symptom schon im Alter von 18 Lebensmonaten mit einer Wahrscheinlichkeit von 66 % erstmals auftreten kann, im Alter von 24 Monaten (m) mit 54 % und im Alter von 60 Monaten mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % (Jeste et al., 2008).

TS ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit, wobei das Syndrom in 70 % der Fälle bedingt durch eine *de novo* Mutation auftritt (de Vries et al., 2007; Jones et al., 1997). Verursacht wird die Erkrankung durch Mutationen in den Genen *TSC1* (Hamartin) und/oder *TSC2* (Tuberin). *TSC1* und *TSC2* regulieren die mTOR-Signalwegkaskade indem sie als Komplex inhibierend auf das Protein *Ras homolog enriched in brain* (RHEB) wirken. Liegt eine Mutation in einem oder in beiden TSC-Genen vor, ist der RHEB-Inhibitions-Komplex nicht vorhanden und mTORC1-Schlüsselproteine werden hyperphosphoryliert, was zu einer Überaktivierung der mTOR-Kinase führen kann (Abb. 1.3) (Garza-Lombo and Gonsebatt, 2016; Troca-Marin et al., 2012).

Die medikamentöse Behandlung der TS ist multidisziplinär. Bei frühkindlichen epileptischen Anfällen wird Vigabatrin eingesetzt. Vigabatrin ist ein Strukturanalog zu dem hemmenden Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und inhibiert das GABA-abbauende Enzym GABA-Aminotransferase (Hsieh et al., 2016; Julich and Sahin, 2014).

Zudem hemmt der Wirkstoff die Aktivität der mTOR-Signalkaskade (Zhang et al., 2013). Die mTOR-Inhibitoren Sirolimus (Rapamycin), Everolimus (Rapamycin analog) und Temsirolimus (Pro-Pharmakon von Rapamycin) zeigen erhebliche Nebenwirkungen und sind nur für die chronische Verabreichung gegen mTOR-bezogene Tumore und Lymphangioliomyomatosen zugelassen. Aktuell befinden sich diese mTOR-Inhibitoren in klinischen Studien, um die Wirkung auf neurologische Symptome zu untersuchen (de Vries, 2010; Ehninger and Silva, 2011).

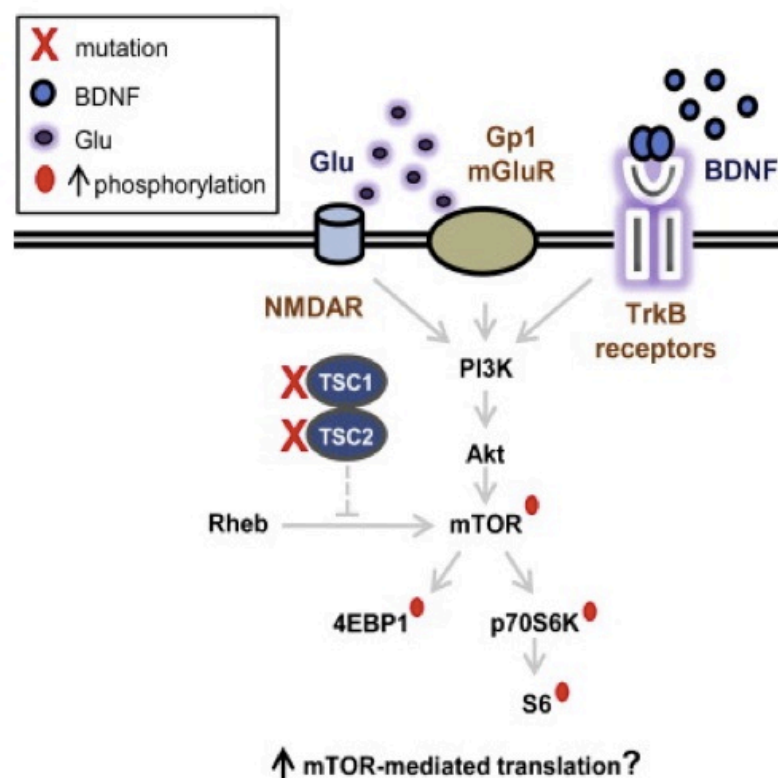


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der fehlregulierten Proteintranslation bei Tuberöser Sklerose (TS). Die Aktivierung der Akt/mTOR-Signalkaskade wird zunächst durch Glutamatrezeptoren oder über TrkB-Rezeptoren durch den Wachstumsfaktor BDNF eingeleitet. Liegt eine Mutation in einem oder in beiden TSC-Genen vor, wird RHEB nicht inhibiert, was zu einer Hyperphosphorylierung von mTORC1-Schlüsselproteinen und in Folge zu einer erhöhten mRNA-Translation führen kann (verändert nach Troca-Marin et al., 2012).

1.3.2 *Tsc*-Tiermodelle

Während Tiermodelle mit konstitutivem, homozygotem Verlust des *Tsc1* oder des *Tsc2*-Gens embryonal letal sind, wurden auch konstitutive, heterozygote Tiermodelle mit entweder einer *Tsc1* oder einer *Tsc2*-Mutation etabliert. Brellie et al. (2006) analysierten die synaptische Plastizität in einem *Tsc2*^{+/-}-Rattenmodell. Die Ergebnisse zeigten deutliche Abnormalitäten der synaptischen Plastizität, einschließlich LTP und LTD in hippocampalen Neuronen, was zu einem Verlust von aktivitätsabhängigen synaptischen Modifikationen führte (von der Brellie et al., 2006). Interessanterweise beschrieben Auerbach et al. (2011), dass die hippocampale mGluR-LTD-Proteintranslation in *Tsc2*^{+/-}-Mäuse vermindert, und nicht wie zuvor erwartet, erhöht ist. Als mögliche Erklärung wird ein kompensatorischer Effekt aufgrund der Hyperphosphorylierung des *FMRP*-Gens angenommen. FMRP ist ein mRNA-Bindeprotein, das als ein Repressor der Translation agiert (Bassell and Warren, 2008; Darnell et al., 2011). Es wird also angenommen, dass eine erhöhte Phosphorylierung von *FMRP* die Repression der Translation verstärkt und somit bei einer Überaktivität der mTOR-Signalkaskade die erhöhte Translation kompensiert (Auerbach et al., 2011; Narayanan et al., 2007; Troca-Marin et al., 2012). Ehninger et al. beschrieben im Jahre 2008 erstmals die kognitive Funktion von adulten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (drei bis sechs Monate alte Weibchen und Männchen) und konnte eine Beeinträchtigung im Hippocampus-abhängigen Lernen in dem *morris water maze* (MWM), in dem *radial maze* -Test und bei der *contextual fear conditioning* zeigen. Die kognitiven Defizite gehen einher mit einer verringerten späten LTP in der hippocampalen CA1-Region. Der mTOR-Inhibitor Rapamycin normalisiert sowohl das Lernverhalten, als auch die synaptische Plastizität (Ehninger et al., 2008). Erwähnenswert ist weiterhin, dass Ehninger et al. (2008) keine Auffälligkeiten in der sozialen Interaktion der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und auch keine Auffälligkeiten im Angstverhalten (*elevated plus maze* und *open field*) feststellen konnten. Weitere Studien beschreiben hingegen Defizite im Sozialverhalten von 30 bis 35 Tage alten *Tsc2*^{+/-}-Männchen (Tang et al., 2014) und acht bis zehn Wochen alten *Tsc2*^{+/-}-Männchen und -Weibchen (Sato et al., 2012). Mit Rapamycin konnte das abnormale Sozialverhalten behoben werden. Tang et al. (2014) zeigte in weiteren Verhaltensversuchen, dass *Tsc2*^{+/-}-Männchen im Alter von 30 bis 35 Tagen kein Angst- und kein repetitives Verhalten präsentieren, jedoch in dem 30 Minuten (min) *novel object recognition task* (NORT) signifikant weniger Zeit mit dem neuen Objekt verbringen. Diese bereits veröffentlichten Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Phänotypentwicklung der konstitutiven *Tsc2*^{+/-}-Mauslinie sowohl alters- als auch geschlechtsspezifisch sein könnten.

Für morphologische Studien wurde gezeigt, dass *Tsc2*^{+/-}-Mäuse aufgrund der mTOR-Hyperaktivität in heranwachsenden corticalen Neuronen eine höhere Dichte an dendritischen Fortsätzen haben, die ebenfalls mit Rapamycin normalisiert werden konnten (Tang et al., 2014).

Für das *Tsc1*^{+/-}-Modell wurden ebenfalls signifikante Defizite im Sozialverhalten und in Hippocampus-basierenden Lerntests beschrieben (Goorden et al., 2007; Sato et al., 2012). Morphologische Studien zeigten für die *Tsc1*^{+/-}-Mäuse längere Dendriten und breitere Dendritenköpfe. Die Dichte der dendritischen Fortsätze ist hingegen verringert (Tavazoie et al., 2005). Weiterhin konnte eine Verschiebung des Gleichgewichts der exzitatorischen und inhibitorischen Übertragung der Synapsen verzeichnet werden, das zu einer Übererregbarkeit der Neuronen im Hippocampus (HC) (Bateup et al., 2013) und auch im Neocortex von *Tsc1*^{+/-}-Mäusen führt (Wang et al., 2007) und somit die mTOR-vermittelte Epileptogenese in TS-Patienten triggern könnte (Lasarge and Danzer, 2014).

Trotz dieser Annahme werden sowohl für das konstitutive *Tsc1*^{+/-}- als auch für das konstitutive *Tsc2*^{+/-}-Tiermodell keine spontanen epileptischen Anfälle beschrieben (Ehninger et al., 2008; Goorden et al., 2007; Onda et al., 1999; Waltereit et al., 2006). Die Ausnahme stellt die Veröffentlichung von Lozovaya et al. (2014) dar. Die Resultate dieser Publikation zeigen für 77 % einer konstitutiven *Tsc1*^{+/-}-Mauslinie spontane Krampfanfälle, die sich bereits ab Postnataltag (P) neun einstellen (Lozovaya et al., 2014). Weiterhin wird in der Literatur das *Tsc1*^{fllox/fllox}-Cre *knockout* (*Tsc1*^{GFAP}CKO)-Mausmodell beschrieben, das eine konditionelle Inaktivierung des *Tsc1*-Gens hauptsächlich in den Gliazellen trägt. *Tsc1*^{GFAP}CKO-Mäuse entwickeln ab der vierten Lebenswoche eine progressive Epilepsie und sterben bereits in einem Alter von drei Monaten (Erbayat-Altay et al., 2007; Uhlmann et al., 2002; Zeng et al., 2008; Zhang et al., 2013).

1.4 mTOR als Schlüsselfunktion während der Gedächtniskonsolidierung

Die Gedächtniskonsolidierung ist definiert als ein Prozess bei dem Erfahrungen aus dem Kurzzeit- und Arbeitsgedächtnis in das Langzeitgedächtnis überführt werden. Dabei kommt es zu synaptischen Konsolidierungsmechanismen, die mit der Proteinsynthese-abhängigen LTP und der strukturellen Plastizität einhergehen (Caroni et al., 2012). Alte Nervenverknüpfungen werden in Folge gestärkt und neue angelegt. Die ersten morphologischen Veränderungen finden bereits in den ersten Stunden nach dem neu Erlernten statt. Dies bedarf einer synaptischen Aktivierung, die zu einer Rekrutierung von Second-Messenger-Systemen und in Folge zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Schließlich erfolgt die Synthese neuer Proteine, die für die strukturellen Veränderungen benötigt werden. Die molekularen Bausteine der Gedächtniskonsolidierung sind in vielerlei Spezies hochgradig konserviert (von *Aplysia californica* über *Drosophila melanogaster* bis hin zu Mäusen). Manipulationen der Konsolidierungskaskade durch Verhalten (z.B. rückwirkende Hemmung), Pharmaka (z.B. Proteinsynthese-Blocker) oder Genetik (z.B. Mutation des *cAMP response element binding* (CREB)-Proteins) blockieren die Gedächtnisformation sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen (Frankland and Bontempi, 2005). Durch molekularbiologische Ansätze konnten erfolgreich Komponenten identifiziert werden, die in die synaptische Konsolidierung beziehungsweise in die Gedächtnisbildung involviert sind. Dabei spielt die mTOR-Signalkaskade eine bedeutende Rolle. Im Rattenmodell wird nach einem Hippocampus-abhängigen Lerntest (*Step-Down Inhibitory Avoidance Task* (IA)) eine mTOR-abhängige Hyperphosphorylierung von mTOR und von *ribosomal protein S6 kinase* (p70S6K) im HC beschrieben (Abb. 1.6) (Bekinschtein et al., 2007). Das Protein p70S6K spielt in der mTOR-Signalkaskade eine zentrale Rolle für die Proteinsyntheseregulation, die für die synaptische Plastizität unerlässlich ist (Tang et al., 2002). Eine bilaterale Verabreichung des mTOR-Inhibitors Rapamycin in die CA1-Region des HC 15 min vor Beginn des Hippocampus-abhängigen IA-Tests führte dazu, dass die Phosphorylierung von p70S6K um 60 % inhibiert wurde. Rapamycin-behandelte Ratten, die eine Retestung 24 Stunden und sieben Tage nach der Trainingseinheit des IA-Tests durchliefen, zeigten signifikante Defizite in der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses. Die Ausbildung des Kurzzeitgedächtnisses blieb jedoch unbeeinflusst, was darauf hinweist, dass die hippocampale mRNA-Translation basierend auf der mTOR-Signalgebung ein wichtiger Schritt in der Gedächtniskonsolidierung ist. Zudem konnte mit der Retestung nach

einer Woche gezeigt werden, dass die Wirkung von Rapamycin auf die Gedächtnisbildung nachhaltig ist (Bekinschtein et al., 2007). Im Jahr 2013 wurde diese Studie von Gafford et al. untermauert. Gafford et al. führten mit Ratten den *contextual fear conditioning* -Test durch. Die Tiere wurden in einem bestimmten angstauslösenden Kontext trainiert. Die Testung erfolgte nach Tag eins, zwei und 36. Western Blot-Analysen von HC und dem medialen präfrontalen Cortex (mPFC) zeigten für Ratten, die zeitnah nach dem Training abgetötet und analysiert wurden, eine erhöhte Phosphorylierung von p70S6K im HC, nicht aber im mPFC. Ratten die erst 36 Tage nach dem Training getestet wurden, präsentierten eine Hyperphosphorylierung von p70S6K in der mPFC-Region, nicht aber im HC. Diese Studien konnten zeigen, dass der HC bei dem Abrufen von kürzlich gemachten Erfahrungen involviert ist. In einer weiteren Studie wurden die Tiere über drei Tage trainiert, die Testung erfolgte 36 Tage später und zeigte, dass im HC eine erhöhte Phosphorylierung von p70s6K vorliegt, was darauf hinweisen könnte, dass der HC eine langfristige Rolle bei der Speicherung des detaillierten kontextabhängigen Angstgedächtnisses spielt (Gafford et al., 2013). Diese Ergebnisse beschreiben also nicht nur, dass die mTOR-Signalkaskade in die Gedächtniskonsolidierung und das Abrufen von Erinnerungen involviert ist, sondern auch, dass das detaillierte fehlerfreie Abrufen des Langzeitgedächtnisses von der hippocampalen Aktivität abhängig sein könnte.

Zeitlich abgestufte retrograde Amnesie nach Hippocampusläsionen, die sowohl im Menschen (Frankland and Bontempi, 2005), als auch in Tiermodellen (*contextual fear conditioning* -Test und *socially-acquired food preference* -Test; (Clark et al., 2002; Frankland and Bontempi, 2005; Kim and Fanselow, 1992) beobachtet wurden, führten zu systembasierten Konsolidierungsmodellen. Squire und Alvarez (1995) and McClelland (1995) stellen die Annahme vor, dass der HC sehr schnell die täglichen Ereignisse speichert, da die hippocampalen Synapsen im Gegensatz zu den corticalen in der Lage sind, sich sehr schnell zu verändern. Der HC wird daher als ein temporärer Aufbewahrungsort von Erlerntem diskutiert, bevor die Informationen in den Cortex transferiert und neu klassifiziert werden. Damit Erinnerungen von dem HC in den Cortex, also von dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis übertragen und gefestigt werden, bedarf es einer gewissen Ruhephase (Konsolidierungsperiode). In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl leichter, kurzer Schlaf als auch nächtlicher Schlaf verschiedene Formen des deklarativen und des nicht-deklarativen Gedächtnisses verbessern (Frankland and Bontempi, 2005; Gais and Born, 2004; Mednick et al., 2002; Stickgold et al., 2000; Walker et al., 2002). Weiterhin kann nächtlicher Schlaf verlorene Erinnerungen wiederherstellen (Fenn et al., 2003) und das

Verstehen der Erinnerungen verbessern (Wagner et al., 2004). Zur Stabilisierung von Erlerntem, findet eine Rekapitulation von neuronalen Aktivitätsmustern statt, die während der Lern-/Wachphase bereits beobachtet wurden. Die Aktivitätsmuster treten synchronisiert sowohl in dem HC, als auch in hippocampal-cortikalen und in cortikalen-cortikalen Netzwerken auf (Sutherland and McNaughton, 2000; Wilson, 2002).

Die Annahme, dass der HC ein temporärer Aufbewahrungsort ist bevor die Informationen in dem Cortex dauerhaft gespeichert werden und, dass das gleiche neuronale Aktivitätsmuster, welches während des Erlernens auftritt im Schlaf rekapituliert wird, bildet die Grundlage für erweiterte Konsolidierungsmodelle. Das Standardkonsolidierungsmodell (Abb. 1.4) beschreibt, dass Erfahrungen zunächst parallel im HC und in den cortikalen Netzwerken kodiert werden. Eine nachfolgende, durch erneute Erinnerung ausgelöste Reaktivierung des hippocampalen Netzwerkes stellt die Aktivierung in den cortikalen Netzwerken wieder her, was zu einer allmählichen Verstärkung der cortikalen-cortikalen Verbindung führt, die es schließlich ermöglichen, dass neue Erinnerungen unabhängig vom HC werden und schrittweise in bereits vorhandene cortikale Erinnerungen integriert werden. Die Stärke der Verbindungen zwischen HC und cortikalen Regionen ist in diesem Modell schnell und transient, während die neuronalen Verbindungen zwischen den cortikalen Regionen sich nur langsam ändern, dafür aber lange fort bestehen (Frankland and Bontempi, 2005; McClelland et al., 1995; Squire and Alvarez, 1995). Nachdem Erinnerungen unabhängig von dem HC in corticale Einheiten aufgenommen wurden, spielt für die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses die Integration des präfrontalen Cortex (PFC) (Abb. 1.6) über reziproke Verbindungen mit sensorischen, motorischen und limbischen Cortexregionen eine bedeutende Rolle. Dabei reguliert der PFC die hippocampale Aktivität während eine Erinnerung abgerufen wird. Ist diese eingehende Erinnerung bereits schon in cortikalen Regionen abgespeichert, hemmt der PFC die hippocampale Aktivität, um die Kodierung von redundanter Information zu verhindern. Das bedeutet, ist eine Erinnerungsabfrage erfolgreich, wird der HC sehr schnell inhibiert. Ist eine bereits bekannte Information vergessen worden, findet keine Inhibierung statt und der HC wird wieder aktiviert. Dieses Modell stimmt mit Studien überein, die zeigten, dass Läsionen oder pharmakologische Inaktivierung des PFC zu einem Auslösen von älteren Erinnerungen führen, nicht aber von jüngeren. Vor allem in Mausmodellen wird beschrieben, dass eine Inaktivierung des PFC in Angstkonditionierungstests zu einem Auslösen entfernt liegender Erfahrungen führt, das Abrufen von kürzlich erworbenen Erinnerungen ist weiterhin möglich (Frankland et al., 2004; Preston and Eichenbaum, 2013). Miller et al. (2001) postulierten weiterhin, dass dem HC die

Bildung neuer Gedächtnisspuren zugesprochen wird, während der PFC für die Flexibilität dieser Spuren verantwortlich ist und somit Erinnerungen in einen Kontext setzt. Nicht nur in Ratten, sondern auch in Affen und Menschen konnte gezeigt werden, dass ein geschädigter PFC dazu führt, dass unterschiedliche kontextbezogene Lernaufgaben nicht gelöst werden können, dass die Dimensionswahrnehmung und die Orientierung gestört sind und, dass es zu einem Ausfall des Ortsgedächtnisses kommt (Dias et al., 1996; Miller and Cohen, 2001; Preston and Eichenbaum, 2013; Rich and Shapiro, 2007).

Im Jahr 1997 publizierten Nadel und Moscovitch die *multi trace theory* (MTT), welche ein alternatives Modell zu der Standardkonsolidierung beschreibt (Abb. 1.4). Das Modell basiert auf der Beobachtung, dass Patienten mit einer Schädigung des HC-Komplexes eine ausgeprägte retrograde Amnesie zeigen, welche hier vorwiegend das autobiographische/episodische Wissen des deklarativen, also des Wissensgedächtnisses betrifft. Diese Studien legen nahe, dass der HC und verwandte Strukturen an der Ausbildung und dem Fortbestand von dem autobiographischen/episodischen Gedächtnis und auch an der räumlichen Gedächtnisbildung beteiligt sind und zur Transformation und Stabilisierung anderer Gedächtnisformen beitragen. Die MTT besagt, dass Erinnerungen in hippocampal-cortikalen Netzwerken kodiert sind und bei Gedächtnisreaktivierung neue Verbindungen von cortikalen Netzwerken in hippocampale Regionen generiert werden. Hippocampale Strukturen liefern einen räumlichen und zeitlichen Kontext, wohingegen cortikale Strukturen das semantische, also kontextfreie Wissen abspeichern. Das Abrufen kontextreicher, episodischer Erinnerungen ist immer von hippocampal-cortikalen Netzwerken abhängig. Gemäß dem MTT-Modell führt eine partielle HC-Läsion eher zum Verlust jüngerer semantischer und episodischer Erinnerungen, da die Proliferation von Gedächtnisspuren von älteren Erinnerungen resistenter gegenüber HC-Schäden ist. Eine komplette HC-Schädigung eliminiert alle episodischen Erinnerungen. Länger zurückliegende semantische Erinnerungen können bei einer Schädigung des HC weiterhin abgerufen werden (Nadel and Moscovitch, 1997).

Zusammenfassend besagt das Modell der Standardkonsolidierungstheorie, dass die Gedächtnisreorganisation in cortikalen Netzwerken stattfindet, wohingegen das MTT-Modell davon ausgeht, dass die Gedächtnisreaktivierung neue Verbindungen von cortikalen Netzwerken in hippocampale Regionen voraussetzt (Frankland and Bontempi, 2005).

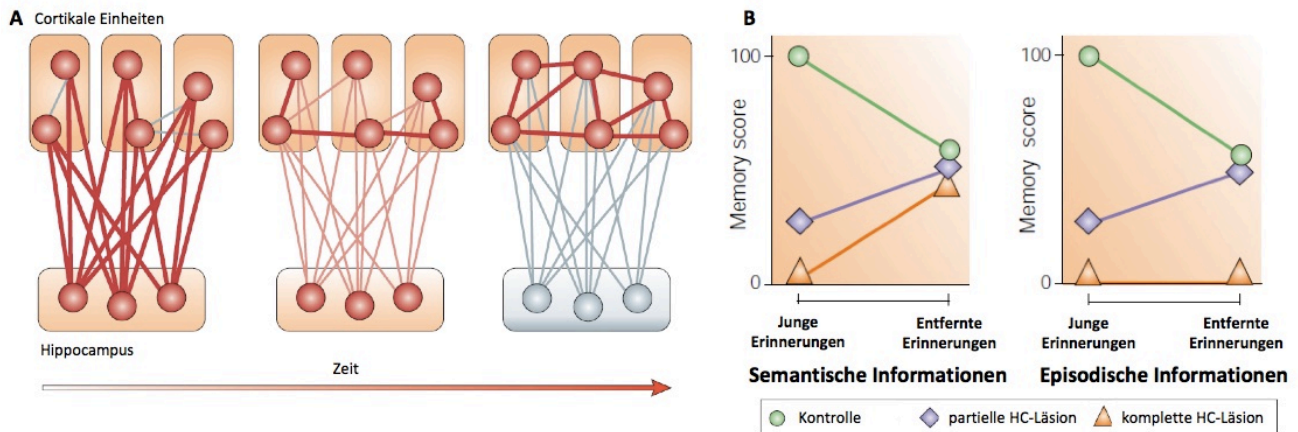


Abbildung 1.4: Gedächtniskonsolidierungsmodelle

- A) Die **Standardkonsolidierungstheorie** geht davon aus, dass die Gedächtnisreorganisation in corticalen Netzwerken stattfindet (modifiziert nach Frankland and Bontempi, 2005).
- B) Die **MTT** besagt, dass eine Gedächtnisreaktivierung neue Verbindungen von corticalen Netzwerken in hippocampale Regionen voraussetzt (modifiziert nach Frankland and Bontempi, 2005).

Der entorhinale Cortex (EC) (Abb. 1.6) befindet sich im Übergang von HC zum Cortex und wird als Knotenpunkt des corticalen Gedächtnisnetzwerks angesehen, da er sowohl reziproke Verbindungen mit dem HC, als auch reziproke Verbindungen mit corticalen Netzwerken eingeht. Die Anatomie dieser Gehirnstruktur lässt darauf schließen, dass Konnektivitätsveränderungen des EC mit einem starken Einfluss auf die Gedächtniskonsolidierung und den Erinnerungsabruf einhergehen könnten (Takehara-Nishiuchi, 2014; van Strien et al., 2009). Klinische Daten, die durch die funktionelle Magnetresonanztomographie des Gehirns erzielt wurden, konnten zeigen, dass der EC bei Probanden aktiviert ist, die sich an eine berühmte Persönlichkeit vor über 20 Jahren erinnern. Passend zu den bereits beschriebenen Erkenntnissen, ist der HC hingegen bei der Erinnerung an eine Person aktiviert, die vor wenigen Jahren berühmt war (Haist et al., 2001). Eine Studie, welche die Funktion des EC in Bezug auf zurückliegende Lernprozesse in einem Tiermodell charakterisierte, legte nahe, dass die EC-Integrität in Erinnerungsprozesse einem Zeitgradienten unterliegt (Cho et al., 1993). In einem kognitiven Verhaltensversuch wurde die Entscheidungsfähigkeit von Mäusen in einem *radial maze* -Test drei Tage, zwei, vier und sechs Wochen vor einer Operation trainiert, in der durch Ibotensäure eine bilaterale EC-Läsion herbei geführt wurde. Während der postoperativen Testphase des *radial maze* -Tests hatten die Gruppen, die den Test drei Tage und zwei Wochen vor der Operation erlernten,

Schwierigkeiten sich für den Arm zu entscheiden, der Futter bereit hielt. Die Gruppen, die den Test bereits vier und sechs Wochen vor der Operation gelernt hatten, erinnerten sich an den Test und waren weiterhin in der Lage sich zwischen leeren Armen und Armen, die Futter bereit hielten zu unterscheiden. Das bedeutet, dass in diesem Mausmodell mindestens vier Wochen erforderlich sind, bevor die Erinnerung an das Erlernte nicht mehr länger von der Integrität des EC abhängig ist (Cho et al., 1993; Takehara-Nishiuchi, 2014).

Kaori Takehara-Nishiuchi fasste 2014 aus aktuellen Studien ein Modell (Abb.1.5) zusammen, das die Rolle des EC als einen „Torwächter“ des cortikalen Gedächtnisnetzwerkes beschreibt, weil diese Gehirnregion befähigt ist, selektiv mit dem HC oder mit dem mPFC in Abhängigkeit von dem Alter der Erinnerungen zu interagieren und somit für die Gedächtniskonsolidierung und für den Abruf von Erinnerungen eine bedeutende Rolle spielt. Um neu Erlerntes in das Gedächtnis zu integrieren und zu speichern (Abb.1.5 links) werden synaptische Verbindungen zwischen den Neuronen des EC und den Neuronen des HC sehr schnell verstärkt. Für die Gedächtniskonsolidierung (Abb. 1.5 Mitte) findet eine Reaktivierung der gedächtnishervorbringenden Neuronen des HC statt, welche darauffolgend die schon zuvor aktivierten Neuronen des EC aktivieren. Weiterhin werden neue Neuronen sowohl im EC, als auch im mPFC angelegt und somit die synaptische Verbindung zwischen EC und mPFC verstärkt. Nachdem die Konsolidierung des Gedächtnisses abgeschlossen ist (Abb. 1.5 rechts), aktiviert der EC in Abhängigkeit von dem Alter der Erinnerung nur noch selektiv Neuronen im HC (jüngere Erinnerungen) oder Neuronen im mPFC (entfernte Erinnerungen) (Frankland and Bontempi, 2005; Takehara-Nishiuchi, 2014).

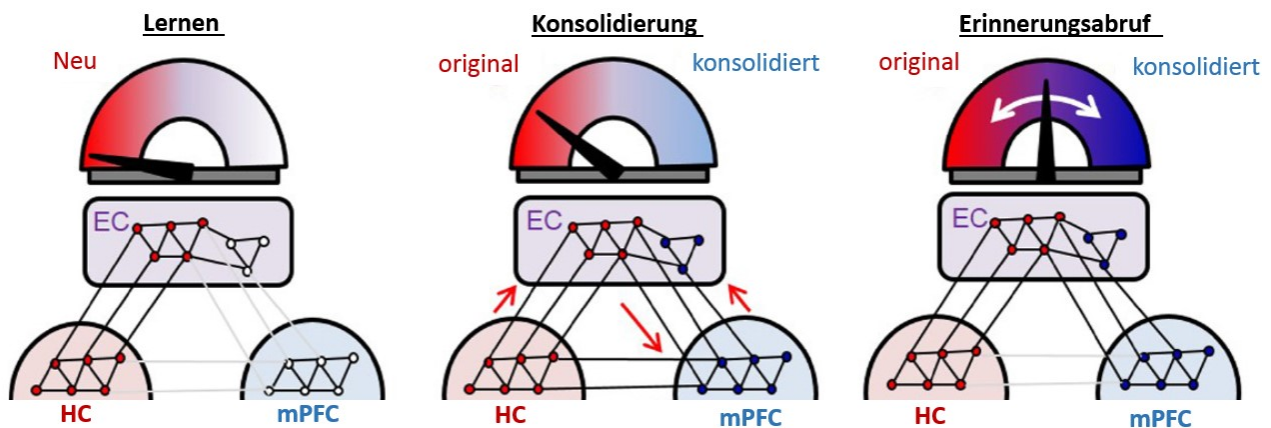


Abbildung 1.5: Der EC als „Torwächter“ im cortikalen Gedächtnisnetzwerk.

Während eines Lernprozesses (links) werden zwischen den Neuronen (rote Punkte) des EC und den Neuronen des HC (rote Punkte) synaptische Verbindungen schnell verstärkt. Für die Gedächtniskonsolidierung (Mitte) findet eine Reaktivierung der gedächtnishervorbringenden Neuronen (rote Punkte) des HC statt, die anschließend die bereits zuvor aktivierten Neuronen (rote Punkte) im EC aktivieren. Neue Neuronen (blaue Punkte) werden in dem EC und in dem mPFC angelegt und somit die synaptische Verbindung zwischen EC und mPFC verstärkt. Während dem Erinnerungsabruf (rechts) aktiviert der EC in Abhängigkeit von dem Alter der Erinnerung selektiv Neuronen im HC oder Neuronen im mPFC (modifiziert nach Takehara-Nishiuchi, 2014).

Der Dentate Gyrus (DG) (Abb. 1.6) besitzt das Privileg, dass seine Neurogenese über das gesamte Erwachsenenalter fortbesteht und somit adulte Neuronen kontinuierlich in die sich verändernden Netzwerke integriert werden können. Der *perforant pathway* verbindet den EC mit dem HC. Die Projektion beginnt in Layer II des EC und endet in den Körnerzellen des DG. Die bestehenden synaptischen Verbindungen zwischen EC und DG sind aufgrund der permanenten Neurogenese des DG sehr plastisch. Diese stetig aktive Modifikation der DG-EC-Verbindung verhindert, dass die DG-Zellen aktiviert werden, welche ursprünglich mit dem EC in Verbindung standen (Abb. 1.5) (Canto et al., 2008; Takehara-Nishiuchi, 2014; van Strien et al., 2009; Witter, 2007).

Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis konnten Kitamura et al. (2009) in einem Rattenmodell zeigen, dass eine reduzierte adulte Neurogenese und somit eine stabile EC-DG-Verbindung, das Angstgedächtnis in einem Hippocampus-abhängigen Angstkonditionierungstest verlängert. Im Gegensatz dazu zeigt eine erhöhte EC-DG destabilisierende Neurogenese, dass das Hippocampus-basierende Angstgedächtnis kürzer abrufbar ist. Die Stabilität der EC-DG-Verbindung bestimmt also maßgeblich die Abhängigkeit des Gedächtnisses von dem HC und zeigt, dass der HC nur für eine limitierte Zeit beim Abruf von Erinnerungen integriert ist

(Kitamura et al., 2009; Takehara-Nishiuchi, 2014). Humane Neuroimaging-Studien verdeutlichen, dass Projektionsdefizite zwischen EC und DG, also in dem *perforant pathways* mit neurologischen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Schizophrenie assoziiert sind (Iseki et al., 1998; McDonald et al., 2000; Robinson et al., 2014). Weiterhin beschreiben Verhaltensstudien in Nagern, dass der EC-DG-Verbindung eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des räumlichen, sozialen und kontextuellen Gedächtnisses zukommt (Basu and Siegelbaum, 2015; Eichenbaum, 2014; Kitamura et al., 2015; Sasaki et al., 2015).

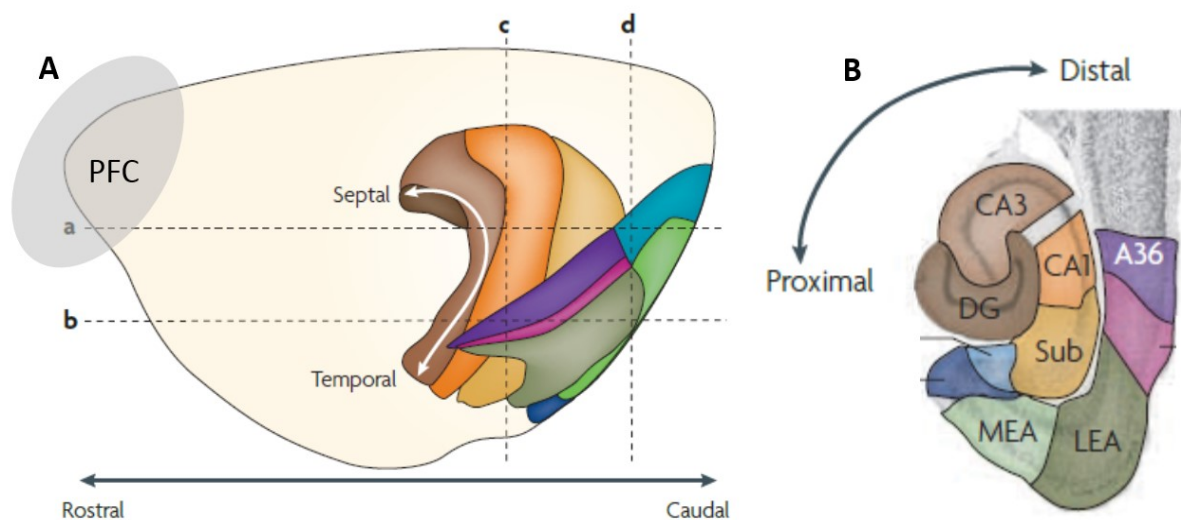


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der in die Gedächtniskonsolidierung involvierten Gehirnstrukturen.

A) Der PFC befindet sich an der Stirnseite und ist in grau eingezeichnet. Er wird in orbitofrontalen, medialen und lateralen Teil untergliedert (nicht eingezeichnet).

A), B) Der EC ist in grün dargestellt und besteht aus einem lateralen (LEA) und medialen (MEA) Teil.

Zum HC gehören die Strukturen DG (dunkel braun), CA3 (mittelbraun), CA2 (nicht gezeigt), CA1 (orange) und Subiculum (gelb) (verändert nach van Strien et al., 2009).

1.4.1 *Immediate-early genes (IEGs)*

IEGs werden in zahlreichen Analysen als zelluläre Marker genutzt, die Neuronen identifizieren, welche durch ein spezifisches Verhalten aktiviert wurden (Guzowski et al., 2001; Kubik et al., 2007). Die neuronale IEG-Expression wird durch synaptische Aktivität reguliert und spielt eine wichtige Rolle bei den für die Gedächtniskonsolidierung wichtigen neuroplastischen Mechanismen (Dragunow, 1996; Kaczmarek, 1993; Robertson, 1992; Tischmeyer and Grimm, 1999). Das c-Fos Protein ist eines der am häufigsten verwendeten Marker, um neuronale Plastizität zu charakterisieren. *c-Fos knockout* Mäuse zeigen eine Beeinträchtigung der LTP und signifikante Defizite, sowohl im kontextabhängigen Lernen (*contextual fear conditioning*), als auch in dem Hippocampus- und orientierungsabhängigen MWM (Fleischmann et al., 2003). Die Infusion von Antisenseoligodesoxynukleotiden gegen *c-Fos* mRNA in murine Hippocampi blockiert die c-Fos Translation. Die durch diese Methode generierten Mäuse zeigen ebenfalls Beeinträchtigungen in kontext- und orientierungsabhängigen Lerntests (z.B. MWM, *socially-acquired food preference* -Test, IA-Task) und stärken somit die zuvor beschriebenen Resultate (Countryman et al., 2005; Guzowski, 2002). *zif268* ist ein weiteres IEG, das häufig als ein zellulärer Marker verwendet wird. Studien mit *zif268 knockout* Mäusen beschreiben auch für dieses Protein eine wesentliche Rolle während der Gedächtniskonsolidierung. *zif268 knockout* Mäuse haben Defizite in der späten LTP und Beeinträchtigungen im Langzeitgedächtnis. Weiterhin beherrschen auch die *zif268 knockout* Mäuse das orientierungsabhängige und Hippocampus-basierende MWM nicht (Jones et al., 2001).

Der Einsatz von IEGs als zelluläre Marker, die Neuronen in aktivierten Gehirnregionen nach einem spezifischen Verhalten identifizieren, wurde bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben und in der vorliegenden Doktorarbeit als Methode genutzt (Albasser et al., 2010; Barbosa et al., 2013; Barker and Warburton, 2011; Hoge and Kesner, 2007; Jones et al., 2001; Mumby et al., 2002).

Ratten, die zur Erforschung sowohl ein bekanntes als auch ein unbekanntes Objekt zur Verfügung hatten, zeigten eine erhöhte hippocampale Expression von *c-Fos*. Ein erhöhtes hippocampales Expressionsmuster von *c-Fos* konnte ebenfalls mit Lerntests beschrieben werden, die räumliche und/oder zeitliche Lernaspekte beinhalteten. Barbosa et al. (2013) studierten das Expressionsmuster von *c-Fos* und *zif268* in unterschiedlichen Gehirnregionen nachdem Ratten Objekterkennungstests mit unterschiedlichen Ansprüchen durchliefen. Während des ersten Tests wurde den Tieren nur ein Objekt gezeigt, bei Test Nummer zwei erhielten die Ratten sowohl ein für sie schon bekanntes Objekt, als auch ein unbekanntes

(NORT) und für Test Nummer drei wurde eine kontextabhängige episodische Gedächtnisbatterie durchgeführt. Die Tiere wurden eine Stunde nach Versuchsexposition abgetötet. Die Expressionsanalysen der unterschiedlichen Gehirnregionen zeigten ein erhöhtes Expressionsmuster für *c-Fos* in der dorsalen DG-Region, in dem perirhinalen Cortex und im HC, sowohl in der Gruppe, die den NORT durchliefen, als auch in der Gruppe, die die kontextabhängige episodischen Gedächtnisbatterie absolvierten. Die *c-Fos* Expressionsanalyse des mPFCs war nur in der NORT-Versuchsgruppe erhöht. Eine erhöhte Expression des IEGs *zif268* nach dem NORT und der kontextabhängigen episodischen Gedächtnisbatterie wurde nur im mPFC gezeigt, wobei nach der kontextabhängigen, episodischen Gedächtnisbatterie auch die *zif268*-Expression in dem perirhinalen Cortex, dem HC und hier vor allem in der CA1-Region erhöht war. Für diese Studie kann herausgestellt werden, dass die IEGs *c-Fos* und *zif268* ein erhöhtes Expressionsmuster in Gehirnregionen zeigten, die mit objektwiedererkennenden Lernaufgaben in Verbindung stehen. Die Aktivierung von CA1, DG und dem perirhinalen Cortex weist darauf hin, dass diese Gehirnregionen in das Abrufen von dem „Warum- und Wo-Gedächtnisses“ involviert sind und dass, sowohl der DG und der perirhinalen Cortex, als auch der mPFC in das Wiedererkennen von Objekten involviert sind (Barbosa et al., 2013). Diese und viele andere Publikationen zeigen, dass abhängig von den jeweiligen Lerntests unterschiedliche neuronale Netzwerke beziehungsweise Gehirnregionen aktiviert werden, die über das Expressionsmuster von IEGs analysiert werden können.

1.5 mTOR als ein Regulator bei chronisch-sozialem Stress (CSS)

Monogene Erkrankungen (vergleiche 1.3) bei denen die mTOR-Aktivität entweder erhöht oder erniedrigt sein kann, gehen oftmals mit einer Autismus-Spektrum-Störung oder autistischen Zügen einher. Gut strukturierte Tage und vertraute Personen sind wesentliche Charakteristika für autistische Kinder. Abweichungen von gewohnten Abläufen führen zu einer erhöhten Stressanfälligkeit, was vor allem zu Verhaltensänderungen in Bezug auf soziale Interaktionen, zu erhöhter Ängstlichkeit und Depressionen führen kann. Diese Faktoren implizieren, dass ein fein abgestimmtes Gleichgewicht der mTOR-Aktivität ein entscheidender Faktor bei der Reaktion auf Stress sein könnte (Chen et al., 2014; Spooren et al., 2012; Troca-Marin et al., 2012).

Über die Funktion der mTOR-Signalkaskade bei CSS ist bislang relativ wenig bekannt. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass die mTOR-aktivierenden Faktoren IGF-1 (Baldini et al., 2013), BDNF (Taliaz et al., 2011) und die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs)

(Harvey and Shahid, 2012) bei der Stressverarbeitung beziehungsweise bei der Ausbildung von Resilienz gegen chronischen Stress eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin ist ein verschobenes Verhältnis von GluA1 zu GluA2 (vergleiche 1.2), sowie Abweichungen der mTOR-abhängigen Synthese von PSD95, die einen erheblichen Einfluss auf die Regulation der neuronalen Erregbarkeit haben, mit einer veränderten Stressverarbeitung assoziiert (Li et al., 2010; Popoli et al., 2012; Schmidt et al., 2010).

Der-Avakian et al. beschrieben im Jahre 2014 die Veränderung der Phosphorylierung von mTOR in der *area tegmentalis ventralis* (VTA) von Ratten die CSS ausgesetzt wurden. Im Vergleich zu Ratten, die nach CSS eine mentale Resilienz vorwiesen und zu Ratten, die nicht gestresst wurden, zeigten stressanfällige Tiere in der VTA eine Hyperphosphorylierung von mTOR (Der-Avakian et al., 2014). Weiterhin wurden sowohl in Maus- als auch in Rattenmodellen mit Hilfe der Verhaltenstests *tail suspension* (TS) und *forced swim* -Test gezeigt, dass der mTOR-Inhibitor Rapamycin eine antidepressive Wirkungen hat (Cleary et al., 2008). Es ist daher anzunehmen, dass der mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle sowohl bei den Auswirkungen von CSS spielt, als auch bei der Ausbildung von resilientem Verhalten nach chronischem Stress.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war das Studium der Phänotypentwicklung und die Charakterisierung der molekularen Mechanismen der TS, um die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden zu ermöglichen. Dabei war zunächst die Frage zu klären, ob das für diese Arbeit verwendete konstitutive *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell des Stamms B6;129S4-*Tsc2*^{tmDjk}/J kognitive Defizite und autistische Verhaltensmuster entwickelt und somit die neurologischen Symptome von TS Patienten modelliert. Sollte dies der Fall sein, war der Frage nachzugehen, in welchem Alter die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse kognitive Defizite und autistische Verhaltensmuster zeigen und welche Gehirnregionen und biochemischen Mechanismen dabei involviert sind. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, wie und warum CSS das Verhalten von *Tsc2*^{+/-}-Mäuse beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien und ihre Hersteller	
Substanz	Hersteller
Agarose	AppliChem GmbH
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth
Ammonium persulfate	Carl Roth
Ampuva, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi
Bromphenolblau	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Carl Roth
cOmplete Tablets EASYpack (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
EDTA	AppliChem GmbH
Essigsäure 100 %	AppliChem GmbH
Ethanol absolut	Honeywell
Ethanol 99 % vergällt	AppliChem GmbH
Ethidiumbromid	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natronlauge	Merk
PBS Tablets	Gibco (life technologies™)
PhosSTOP EASYpack	Roche

(Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets)	
RNAlater	Sigma-Aldrich
Rotiphorese ^R Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	Carl Roth
Salzsäure 32 %	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Trizol ^R Reagenz	Ambion (life technologies TM)
Tween-20	Carl Roth
UltraPure TM Temed	Invitrogen TM
Wasserstoffperoxid 30 %	Merk
Western Lightning ^R Plus-ECL- Detektionsreagenz	PerkinElmer ^R

2.1.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung	
Puffer/Lösung	Zusammensetzung
APS 10 %	10 % APS in destilliertem Wasser lösen, aliquotieren und bei 4°C lagern
Laemmli-Puffer (1x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Magic Mix (2x)	48 % Harnstoff, 15mM Tris (pH 7,5), 8,7 % Glycerin, 1 % SDS, 143mM β -Mercaptoethanol, 1x Protease- und 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten
PBS-T-Waschpuffer	0,1 % Tween-20 in 1x PBS
Proteinase K	200 mg in 10 ml lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern
Proteingelpuffer I	1,5 M Tris (pH 8,8)
Proteingelpuffer II	0,5 M Tris (pH 6,8)
SDS 10 %	10 % SDS in destilliertem Wasser lösen und bei RT lagern

TAE (50x)	5 mM EDTA, 2 M Tris, 1 M Essigsäure
Verdauungspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8), 5mM EDTA (pH 8), 200 mM NaCl, 0,2 % SDS

2.1.3 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Tabelle 2.3: Kits und ihre Hersteller	
Kit	Hersteller
FastStart™ Taq DNA Polymerase, dNTPack	Roche Diagnostics GmbH
High Pure RNA Tissue Kit	Roche Diagnostics GmbH
NucleoSpin®Tissue Kit	Macherey-Nagel GmbH
QIAshredder™	Quiagen
SYBR® Premix Ex Taq™ II	Takara
Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer System	Bio-Rad

2.1.4 Längenstandards und Ladepuffer

Tabelle 2.4: Marker und ihre Hersteller	
DNA-Marker	Hersteller/Zusammensetzung
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
DNA-Ladepuffer	
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Scientific
Protein-Marker	
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Proteinladepuffer (2x)	48 % Harnstoff, 15mM Tris (pH 7,5), 8,7 % Glycerin, 1 % SDS, 143 mM β-Mercaptoethanol, 0,004 % Bromphenolblau

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.5: Enzyme und ihre Hersteller	
Enzyme	Hersteller
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH
PrimeScript™ RT MasterMix	Takara
Proteinase K	AppliChem GmbH

2.1.6 Primäre Antikörper

Tabelle 2.6: Primäre Antikörper und ihre Hersteller	
Antikörper	Hersteller
AMPA receptor (GluR1) Rabbit	Cell Signaling
AMPA receptor (GluR2) Rabbit	Cell Signaling
Anti-Actin antibody rabbit	Sigma
PSD95 Monoclonal Antibody	Thermo Fisher
Phospho-S6 Ribosomal Protein Antibody	Cell Signaling
S6 Ribosomal Protein Antibody	Cell Signaling
Tuberin/Tsc2 XP Rabbit mAb	Cell Signaling

2.1.7 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.7: Sekundäre Antikörper und ihre Hersteller	
Antikörper	Hersteller
Goat-Anti-Rabbit IgG HRP	Jackson ImmunoResearch
Goat-Anti-Mouse IgG HRP	Jackson ImmunoResearch

2.1.8 Primer

Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich in einer Konzentration von 100 μ M geliefert und in einer Stocklösung 1:10 mit Ampuwa-Wasser verdünnt.

2.1.8.1 Primer für Genotypisierungen

Tabelle 2.8: Primer für Genotypisierungen, ihre Sequenzen und Produktlängen		
Primername	Sequenz (5'-3')	Produktlänge [bp]
Tsc2_wt_f	AAAGCTCAGCCCTTTTCCTC	131
Tsc2_com_r	CAAACCCACCTCCTCAAGC	
Tsc2_mut_f	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG	165
Tsc2_com_r	CAAACCCACCTCCTCAAGC	

2.1.8.2 Primer für die RT-qPCR

Tabelle 2.9: Primer für RT-qPCRs , ihre Sequenzen und Produktlängen		
Primername	Sequenz (5'-3')	Produktlänge [bp]
c-Fos_f	GGGCTGCACTACTTACACGT	169
c-Fos_r	TGCCTTGCCTTCTCTGACTG	
Zif268_f	ATGAGAAGGCGATGGTGGAG	154
Zif268_r	CTCACGAGGCCACTGACTAG	
GAPDH_f	TCCATGACAACCTTTGGCATT	377
GAPDH_r	GTTGCTGTTGAAGTCGCAGG	

2.1.9 Biologisches Material

2.1.9.1 Mauslinien

Für die Versuche der vorliegende Doktorarbeit wurde der Mausstamm B6;129S4-*Tsc2*^{tmDjk/J} verwendet, welcher von der Firma *The Jackson Laboratory* generiert wurde. Hierbei handelt es sich um einen konstitutiven *knockout* des *tuberous sclerosis 2 (Tsc2)*-Gens. Um das *Tsc2*-Gen zu unterbrechen, wurde eine Kassetten mit einer Neomycin-Resistenz und einem Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Gen in das Exon 2 des *Tsc2*-Gens auf Chromosom 17 integriert. Das Konstrukt wurde in 129S4/SvJae-derivierte J1 Stammzellen eingebracht. Erfolgreich elektroporierte Stammzellen wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Die daraus resultierenden chimären Tiere wurden mit C57BL/6 gekreuzt. Die heterozygoten Nachkommen wurden wiederum miteinander verpaart.

Tsc2^{+/-}-Mäuse sind lebensfähig, fertil, normal groß und weisen keine physischen Auffälligkeiten auf. Im Alter von 12 bis 15 Monaten entwickeln alle heterozygoten Mäuse vielfältige bilaterale Zystenadenome der Nieren. *Tsc2*^{+/-}-Mäuse die älter als 15 Monate sind, entwickeln mit einer 50-prozentigen Wahrscheinlichkeit Hämangiome der Leber und bei 10 % kommt es zu Angiosarkomen der Extremitäten oder Karzinomen der Nieren. Verursacht durch eine Leberhypoplasie haben homozygote Mäuse einen embryonal-letalen Phänotypen. Die Embryonen sterben zwischen den Embryonaltagen (E) 9.5 und 12.5 im Mutterleib und werden tot geboren. (Onda et al., 1999)

Die Zucht der *Tsc2*^{+/-}-Linie wurde in dem *Translational Animal Research Center (TARC)* durchgeführt. Die TARC ist eine Plattform der Universitätsmedizin und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, die insbesondere die räumliche, personelle und investive Grundausstattung für den Versuchstierbedarf von Sonderforschungsbereichen bereitstellt. Für die Verhaltensversuche und Operationen wurden die Mäuse in die *Mouse Behavior Unit (MBU)* überführt, die sich in demselben Gebäude wie die TARC befindet.

Für die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich *Tsc2*^{+/-}-Männchen (vergleiche 2.1.9.2) eingesetzt, die zur Habituation bereits eine Woche vor Versuchsbeginn von der TARC in die MBU transferiert wurden. *Tsc2*^{+/-}-Männchen resultierten aus der Verpaarung eines Zuchtpaares mit den Genotypen *Tsc2*^{+/-} und *Tsc2*^{+/-} oder *Tsc2*^{+/-} und *Tsc2*^{+/+} (Tabelle 2.10). Wildtypische Geschwistertiere dienten in den absolvierten Analysen als Kontrolltiere (vergleiche 2.1.9.2)

Tabelle 2.10: Zuchtstrategie der <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mauslinie	
<i>Tsc2</i> ^{+/-} x <i>Tsc2</i> ^{+/-}	
25 % <i>Tsc2</i> ^{-/-}	embryonal letal
50 % <i>Tsc2</i> ^{+/-}	gewünschter Genotyp für die Analyse des Phänotypen
25 % <i>Tsc2</i> ^{+/+}	Kontrolltiere für die Analyse des Phänotypen
<i>Tsc2</i> ^{+/-} x <i>Tsc2</i> ^{+/+}	
50 % <i>Tsc2</i> ^{+/-}	gewünschter Genotyp für die Analyse des Phänotypen
50 % <i>Tsc2</i> ^{+/+}	Kontrolltiere für die Analyse des Phänotypen

2.1.9.2 Basisdaten der für die Verhaltensversuche verwendeten Mäuse

Tabelle 2.11: Basisdaten der für Experimente verwendeten Mäuse				
Tier ID	Genotyp	Geschlecht	Alter [Monate] im Experiment	Experiment
3059	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3060	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3061	wt	m	3	7 d NORT
3070	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3071	wt	m	3	7 d NORT
3049	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3050	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3051	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3063	wt	m	3	7 d NORT
3064	wt	m	3	7 d NORT
3065	wt	m	3	7 d NORT
3066	wt	m	3	7 d NORT
3056	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3057	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3058	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	7 d NORT
3069	wt	m	3	7 d NORT

2673	wt	m	8	7 d NORT
2774	wt	m	8	7 d NORT
2775	wt	m	8	7 d NORT
2682	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2683	wt	m	8	7 d NORT
2684	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2691	wt	m	8	7 d NORT
2692	wt	m	8	7 d NORT
2697	wt	m	8	7 d NORT
2699	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2725	wt	m	8	7 d NORT
2700	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2702	wt	m	8	7 d NORT
2701	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2703	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2704	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2705	wt	m	8	7 d NORT
2706	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2707	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2708	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2721	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2722	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2723	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
2724	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	7 d NORT
1940	wt	m	3	24 h NORT
1941	wt	m	3	24 h NORT
1942	wt	m	3	24 h NORT
1944	wt	m	3	24 h NORT
1946	wt	m	3	24 h NORT

1952	wt	m	3	24 h NORT
1954	wt	m	3	24 h NORT
1951	wt	m	3	24 h NORT
1943	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
1945	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
1947	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
1948	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
1950	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
1951	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3	24 h NORT
2435	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2436	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2437	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2444	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2445	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2446	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2451	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2452	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2453	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2477	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2478	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2485	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2490	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2491	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2492	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2493	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2494	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2495	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2496	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2497	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM

2505	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2506	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2507	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2508	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2509	wt	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2562	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2563	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2564	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
2565	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3, 4, 8	2 x 24 h NORT, 2 x MWM
3009	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
3004	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3005	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3006	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3007	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3008	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2302	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2290	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2293	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2291	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2292	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2294	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2297	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2298	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2300	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2301	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2303	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2305	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2309	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2310	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS

2331	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2332	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2334	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2336	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2339	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2338	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2998	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2999	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3010	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3011	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3012	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
3033	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2304	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2306	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2307	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2308	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2328	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2329	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2330	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2335	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2337	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2345	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2359	wt	m	2	SI, NB, EPM, YM, TS
2865	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2893	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2895	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2896	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2892	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2900	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS

2902	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2906	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2905	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2867	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2855	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2856	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2860	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2886	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YL, TS
2877	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YL, TS
2894	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YL, TS
2903	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YL, TS
2907	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2909	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2179	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2195	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2197	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2198	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2200	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2201	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2133	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2138	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2140	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2165	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2166	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2167	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2196	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2202	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, SA
2134	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, SA
2333	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS

2799	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2798	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2789	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2791	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2793	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2878	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2879	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2880	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2849	wt	m	4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS
2851	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2859	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2854	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2837	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2638	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2844	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2845	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2850	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2853	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
2852	wt	m	4	SI, NB, EPM, YM, TS
1386	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1567	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1469	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1395	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1396	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1397	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1438	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1442	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1443	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1448	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI

1450	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1463	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1661	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1388	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1474	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1475	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1476	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1480	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1498	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1580	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1500	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1506	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1509	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1510	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1565	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1387	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1393	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1394	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1398	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1399	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1615	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1660	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1614	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1449	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1451	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1457	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1462	wt	m	3-4	CSS, SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1499	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1507	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI

1357	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1566	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1569	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1571	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1572	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1589	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1596	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1606	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1613	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1440	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI
1400	wt	m	3-4	SI, NB, EPM, YM, TS, PPI

2.1.9.3 Basisdaten der verwendeten murinen Gehirne

Tabelle 2.12: Basisdaten der verwendeten murinen Gehirne					
Tier ID	Genotyp	Geschlecht	Alter [Monate]	verwendete Gehirnregionen	Experiment
4834	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4835	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4836	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4837	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4838	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4839	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4840	wt	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4831	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4832	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4851	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4852	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4853	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	2	C, PFC, HC	Western Blot
4348	wt	m	4	C, PFC, HC	Western Blot

4350	wt	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4351	wt	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4352	wt	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4366	wt	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4349	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4364	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4365	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
4367	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	4	C, PFC, HC	Western Blot
3952	wt	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2770	wt	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2911	wt	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2749	wt	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2768	wt	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
3954	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2913	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2912	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2774	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
2777	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	8	C, PFC, HC	Western Blot
3435	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3436	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3439	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3440	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3426	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3427	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3369	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3370	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3371	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3372	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
3433	wt	m	9	EC	NORT,RT-qPCR

3434	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	9	EC	NORT,RT-qPCR
2673	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2774	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2775	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2683	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2684	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2684	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2699	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2700	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2682	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2691	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2692	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2697	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2702	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2701	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2703	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2704	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2706	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2705	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2708	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2723	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2725	wt	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2707	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC,DG	NORT,RT-qPCR
2721	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2722	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
2724	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3063	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3064	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3065	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR

3066	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3062	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3049	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3050	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3040	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3041	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3042	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3056	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3057	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3058	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3069	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3071	wt	m	10	C, PFC,HC, DG	NORT,RT-qPCR
3061	wt	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3043	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3060	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR
3070	<i>Tsc2</i> ^{+/-}	m	10	C, PFC, HC, DG	NORT,RT-qPCR

2.1.10 Software und Datenanalyse

2.1.11 EDV-Programme

Tabelle 2.13: Name, Version und Anwendung der für die Dissertation verwendeten EDV-Programme		
Name	Version	Anwendung
EndNote	X7 V5	Literaturverzeichnis
EthoVision	XT 8.5	Analyse Verhaltensversuche
Image Lab	V5	Proteinquantifizierung
GraphPad Prism	7	Statistische Analysen

2.1.12 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software durchgeführt. Exemplarisch wurden jeweils eine Expressionsstudie, eine Proteinanalyse und ein Verhaltensversuch mittels dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung geprüft. In Folge dessen wurden Proteinanalysen unter Annahme einer Normalverteilung mit dem ungepaarten t-Test ausgewertet. Für Expressionsstudien und Verhaltensversuche wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Verhaltensversuche, welche multiple Vergleiche voraussetzten, wurden zunächst mit dem *two-way analysis of variance* (ANOVA)-Test und darauffolgend mit dem *Turkey's Multiple Comparison* -Test analysiert.

Ein Signifikanzwert (p-Wert) kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern in der jeweiligen Abbildung gekennzeichnet. Ein p-Wert kleiner als 0,01 wurde als ein sehr signifikantes Ergebnis verstanden und mit zwei Sternen versehen. War ein p-Wert kleiner als 0,001 wurde dieses Ergebnis als hoch signifikant verstanden und mit drei Sternen dargestellt. Ein höchst signifikantes Ergebnis bekam vier Sterne verliehen und besaß einen p-Wert kleiner als 0,0001.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Ergebnissen in den Balkendiagrammen als Standardfehler dargestellt.

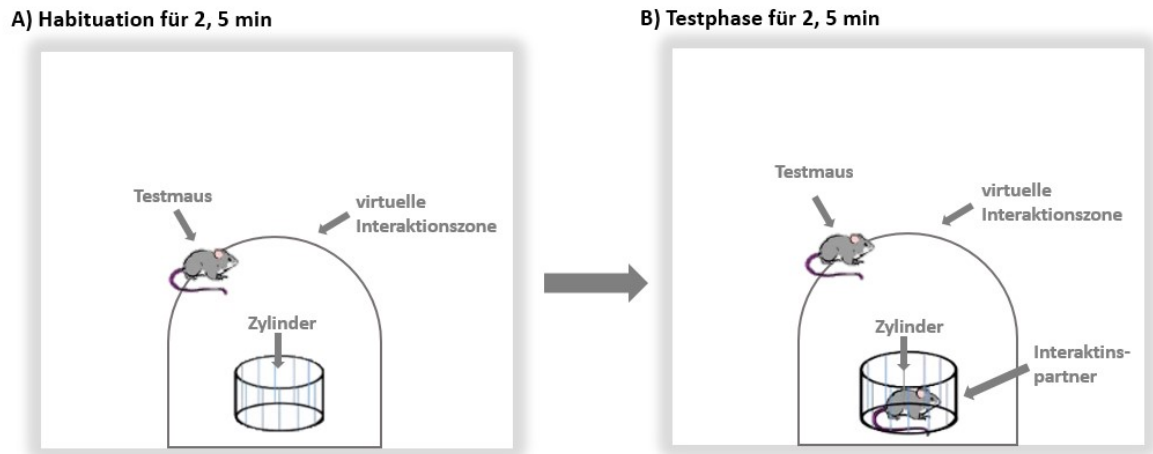
2.2 Methoden

2.2.1 Verhaltensstudien mit *Tsc2*^{+/-}-Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen

2.2.1.1 Sozialverhalten

2.2.1.1.1 *Social Interaction (SI)*

Um den Umgang von zwei Mäusen miteinander zu studieren, wurde der SI-Test genutzt (Abb. 2.1). Der Versuch wurde bei einer Lichtstärke von 40 lux in einer weißen Box mit einem Durchmesser von 40 mal (x) 40 Centimetern (cm) durchgeführt. An eine Innenwand der Box wurde ein Maschendraht-Zylinder gestellt, der sich in der virtuellen Interaktionszone befindet. Die virtuelle Interaktionszone war in einem Radius von 8 cm um den Zylinder lokalisiert. Das Experiment untergliederte sich in Habituation und Testphase. Für die Habituation befand sich ein leerer Maschendraht-Zylinder in der Box. Die Testmaus wurde für 2,5 min in die Box gesetzt und die Zeit, die die Maus in der Interaktionszone verbrachte, wurde mit Hilfe eines Videoüberwachungssystems und dem Computerprogramm EthoVision aufgezeichnet. Für die Testphase saß in dem Maschendraht-Zylinder ein weißer Bock des Stamms CD1. Diese Maus war für die Testmaus unbekannt. Die Testmaus wurde erneut für 2,5 min in die Box gesetzt und die Verweildauer in der Interaktionszone wurde aufgezeichnet. Für die Auswertung wurde der SI-Index verwendet. Dieser Index beschreibt die Interaktionszeit mit dem fremden Interaktionspartner dividiert durch die Interaktionszeit, die die Testmaus mit dem leeren Zylinder verbringt. Das Ergebnis wurde mit 100 multipliziert.



C) SI-Index:

$$\frac{\text{Interaktionszeit Maus in sek}}{\text{Interaktionszeit ohne Maus in sek}} \times 100$$

Abbildung 2.1: Social Interaction (SI)

- A)** Eingewöhnungsphase für 2,5 min in einer Box mit einem leeren Maschendraht-Zylinder, der sich in der virtuellen Interaktionszone befindet.
- B)** Testphase für 2,5 min direkt im Anschluss an die Habituation. In dem Maschendraht-Zylinder sitzt ein unbekannter Interaktionspartner.
Das Computerprogramm EthoVision misst die Verweildauer der Testmaus in der Interaktionszone während A) und B).
- C)** Die Interaktionszeit wird über den SI-Index ermittelt.

2.2.1.1.2 Nest Building (NB)

Die Motivation zum Nestbau ist ein weiterer Test, um das Sozialverhalten einer Maus zu analysieren. Der Nestbau hat für eine Maus nicht nur eine Schutzfunktion, sondern die Qualität des erbauten Nests kann Aufschluss darüber geben, wie fürsorglich sich eine Maus um ihren Nachwuchs kümmert (Deacon, 2006). Es wurde gezeigt, dass sowohl Weibchen als auch Männchen ein vergleichbares Nestbauverhalten zeigen und Nester in der gleichen Größe und Qualität bauen (Lisk et al., 1969). Für das Experiment wurden zunächst alle Anreicherungsgegenstände aus den Käfigen der zu analysierenden Mäuse entfernt. Etwa eine Stunde vor der dunklen Phase wurde den einzeln sitzenden Mäusen ein Nestlet (Nestlet-Material von Zoonlab) in den Käfig gelegt (Abb. 2.2). Die Nestlets wurden zuvor gewogen und sollten zwischen 2 bis 3 g wiegen. Das genaue Gewicht von jedem einzelnen Nestlet wurde notiert. 24 Stunden später wurden die Nester anhand einer Bewertungsskala von eins bis fünf bewertet, wobei Rangnummer eins einem Nest zuzuordnen war, bei dem das Nestlet noch mehr als 90 % intakt war. Rangnummer fünf wurde vergeben, wenn mehr als 90 % des Nestlets verwendet wurde (Deacon, 2006). Ebenso wurden die nicht verwendeten Nestletreste erneut gewogen, um das Gewicht mit dem Ausgangswert vergleichen und die Menge an verarbeitetem Nestlet bestimmen zu können.

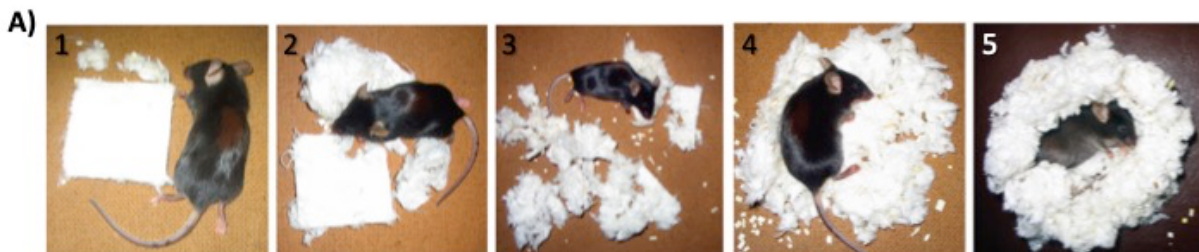


Abbildung 2.2: Nestbauanalyse zur Charakterisierung des Sozialverhaltens.

- A) Bewertungsskala von eins bis fünf, wobei eine Rangnummer von eins ein Nest beschreibt, bei dem weniger als 90 % des Nestlets für den Nestbau verwendet wird. Eine Rangnummer von fünf wird vergeben, wenn die Maus mehr als 90 % des Nestlets für den Nestbau benutzt (Deacon, 2006).

2.2.1.2 Angstverhalten

2.2.1.2.1 *Elevated Plus Maze (EPM)*

Der EPM-Test ermöglicht Aussagen über das Angstverhalten einer Maus. Bei der für den EPM-Test verwendeten Apparatur handelt es sich um ein plusförmiges, erhöhtes Areal (40 cm über dem Boden), das zwei offene und zwei geschlossene Arme (mit Umrandung von 15 cm) der Fläche 30 x 5 cm aufweist, die über eine Zentralfläche von 5 x 5 cm miteinander verbunden sind (Abb. 2.3). Die Maus wurde bei einer Lichtstärke von 100 lux einmalig in das zentrale Areal gesetzt und für 5 min mittels eines Videüberwachungssystems in ihrem Verhalten aufgezeichnet. Mit Hilfe des Computerprogramms EthoVision wurde die Verweildauer, Laufstrecke und Häufigkeit des Betretens der offenen Arme im Vergleich zu den geschlossenen Armen ausgewertet. Ein erhöhter Aufenthalt in den geschlossenen Armen, im Vergleich zu den offenen deutet auf eine erhöhte Ängstlichkeit der zu analysierenden Maus hin.

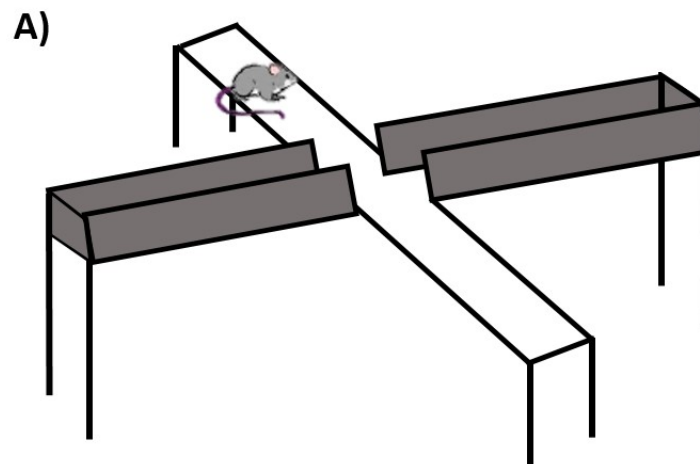


Abbildung 2.3: *Elevated Plus Maze (EPM)* zur Charakterisierung des Angstverhaltens einer Maus.

- A) Die Apparatur ist ein erhöhtes, plusförmiges Areal und besteht aus zwei offenen und zwei geschlossenen Armen. Die Verweildauer, Laufstrecke und Häufigkeit des Betretens der offenen Arme im Vergleich zu den geschlossenen Armen wird in einer fünfminütigen Testphase mit einem Videüberwachungssystem aufgezeichnet und mit dem Computerprogramm EthoVision ausgewertet.

2.2.1.3 Testung der kognitiven Leistung

2.2.1.3.1 *Spontaneous Alternation in Y maze (YM)*

Das YM ist ein Hippocampus-basierender Test und wurde verwendet, um kognitive Defizite in Versuchsmäusen zu quantifizieren. Der Test erfolgte bei einer Lichtstärke von 40 lux in einem Y-förmigen Labyrinth mit drei schwarzen, opaken Plastikarmen die in einem Winkel von 120 Grad zueinander stehen (Abb. 2.4). Die Maus wurde einmalig in einen der drei Arme gesetzt und für 10 min mittels eines Videoüberwachungssystems in ihrem Verhalten aufgezeichnet. Während den 10 min durfte die Maus sich in allen drei Armen frei bewegen. Typischerweise erforschen Mäuse neue Umgebungen und bevorzugen aus dieser Bereitschaft heraus einen neuen Arm des Labyrinths, anstatt in den Arm zurückzukehren, der zuvor schon besucht wurde. Die Maus musste sich also erinnern, welcher Arm des Labyrinths zuvor schon erkundet wurde und entscheiden, welcher Arm als nächstes besucht wird. Die spontanen Richtungswechsel, die binnen der zehnminütigen Testphase von der Maus getätigt wurden, wurden manuell gezählt und in Prozent ausgewertet.

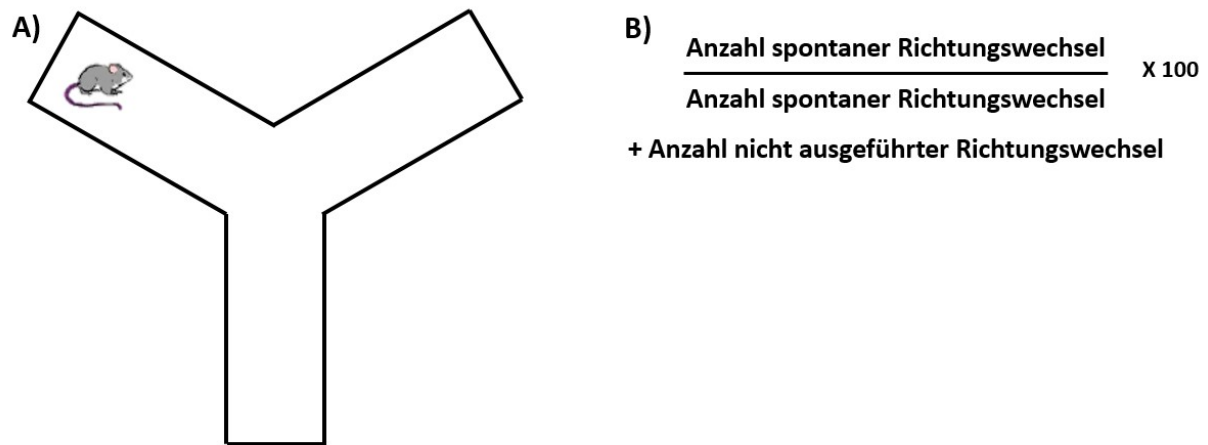


Abbildung 2.4: Spontaneous Alternation in Y maze (YM) zur Quantifizierung kognitiver Defizite.

- A)** Y-förmiges Labirynth mit drei schwarzen, opaken Plastikarmen in einem Winkel von 120 Grad. Die Maus wird in einen der drei Arme gesetzt und für zehn min mittels eines Videüberwachungssystems in ihrem Verhalten aufgezeichnet.
- B)** Die spontanen Richtungswechsel der Versuchstiere, die binnen der zehnminütigen Testphase getätigt wurden, werden manuell ausgewertet und in Prozent angegeben.

2.2.1.3.2 Morris Water Maze (MWM)

Der MWM (Abb. 2.5) ist ein experimenteller Verhaltenstest zur Untersuchung räumlich-navigatorischer Lernvorgänge, an denen vor allem der Hippocampus beteiligt ist. Mäuse empfinden Schwimmen als aversiv und versuchen diesem Verhalten zu entkommen. Diese natürliche Aversion wird bei diesem Lern- und Gedächtnistest ausgenutzt. In einem über zwei Tage (visuelles MWM) beziehungsweise acht Tage (verstecktes MWM) andauernden Test wurde die Maus in einem auf 21 Grad Celsius (°C) geheizten Wassertank (Durchmesser 1,2 m) bei einer Lichtintensität von 100 lux schwimmen gelassen. Die Maus sollte in der ersten Trainingsphase (visueller MWM) zunächst lernen auf eine mit einer Fahne markierten Plattform (neun mal neun cm) zu schwimmen. Für die zweite Trainingsphase (verstecktes MWM) wurde die Fahne von der Plattform entfernt. Die Plattform befand sich 1,5 cm unter der Wasseroberfläche und war ohne Fahne für die Maus nicht mehr sichtbar. Das Versuchstier musste sich nun merken, in welchem Quadrant die Plattform zu finden war. Zur Orientierung wurden seitlich des Schwimmbeckens ausgeprägte Markierungen, sogenannte externe Hinweisreize angebracht. Der Test wurde viermal pro Tag jeweils für 1,5 min durchgeführt. Dabei wurde das Versuchstier von jeder Seite einmal in den Wassertank gesetzt - einmal in

den Quadranten in dem sich die Plattform befindet (PQ), einmal in den Quadranten der sich gegenüber von PQ befand (PG), einmal in den Quadranten der links (PL) und einmal in den Quadranten der rechts (PR) von der Plattform gelegen war. Nach der letzten Trainingseinheit an Tag acht wurde die Plattform aus dem Schwimmbecken herausgenommen. Die Versuchstiere wurden erneut für 1,5 min schwimmen gelassen. Mittels eines Videoüberwachungssystems wurden die Mäuse in ihrem Verhalten aufgezeichnet und die Zeit, die die Mäuse in den jeweiligen Quadranten verbrachten, wurde mit Hilfe des Computerprogramms EthoVision ausgewertet.

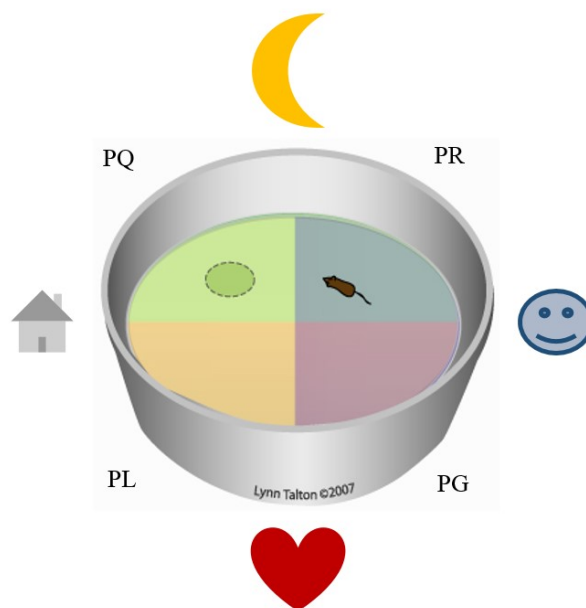
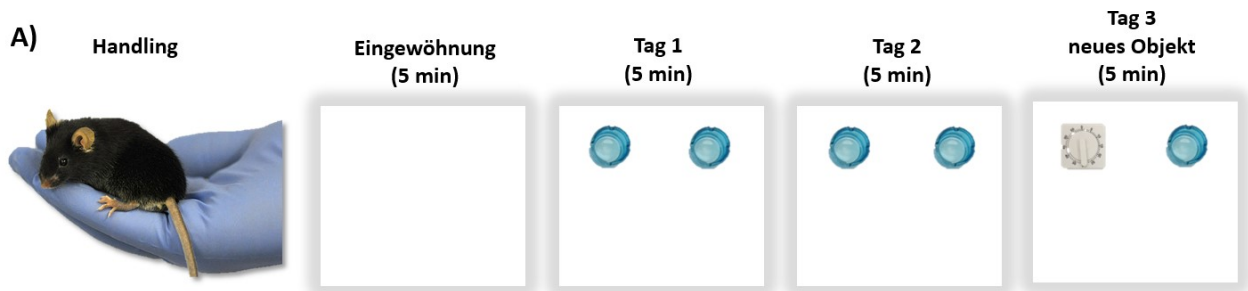


Abbildung 2.5: Morris Water Maze (MWM)

zur Untersuchung räumlich-navigativer Lernvorgänge. Das Schwimmbecken mit einem Durchmesser von 1,2 m wird virtuell in Plattform Quadrant (PQ), Plattform rechts (PR), Plattform links (PL) und Plattform gegenüberliegend (PG) geviertelt. In PQ befindet sich eine Plattform, die für die Trainingsphase 1 (Tag 1-2) mit einer Fahne sichtbar gekennzeichnet ist. Für die Trainingsphase 2 (Tag 3-10) wird die Fahne von der Plattform entfernt und ist somit für die Maus nicht mehr sichtbar. Zur Orientierung sind seitlich des Schwimmbeckens Markierungen angebracht. Das Training wird 4 x pro Tag jeweils für 1,5 min durchgeführt. Für die Testphase an Tag 10 wird die Plattform entfernt und die Verweildauer in den einzelnen Quadranten wird mit einem Videoüberwachungssystem aufgezeichnet und mit EthoVision ausgewertet (Abbildung verändert nach https://mri.tau.ac.il/Animal_Morris_Water_Maze).

2.2.1.3.3 24 Hours Novel Object Recognition Task (24 h NORT)

Der 24 h NORT (Abb. 2.6) basiert auf dem Versuchsvorhaben, dass eine Maus Objekte wiedererkennt und zwei unterschiedliche Objekte voneinander unterscheidet. Somit lässt dieser Verhaltensversuch ebenfalls die Analyse von kognitiven Fähigkeiten zu. Die Durchführung erfolgte in einer weißen Box mit einem Durchmesser von 40 x 40 cm und einer Beleuchtungsstärke von 65 lux. Bevor der eigentliche Versuch gestartet wurde, war es notwendig die Versuchstiere ausführlich zu händeln und sie in ihren Gruppen, also zusammen mit ihren Käfiggenossen in der Versuchsbox laufen zu lassen. Einen Tag vor Versuchsbeginn kam jede Maus einzeln für 5 min in die Versuchsbox. An Tag eins und Tag zwei wurden jeder einzelnen Maus für 5 min zwei identische Objekte gezeigt (Lernphase). Diese Objekte wurden in beide Ecken der Box, circa acht cm von den Wänden entfernt platziert. An Tag drei wurde eines der beiden Objekte gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht. Jede Maus bekam erneut für 5 min Zeit die Objekte zu erkunden (Testphase). Nach jeder einzelnen Maus wurden Arena und Objekte gereinigt, um die Beeinflussung durch den Geruchssinn zu vermeiden. Zudem wurde die Position der neuen und bekannten Objekte miteinander vertauscht, um eine rechts-links Neigung der Mäuse auszugleichen. Die Zeitspanne, die die Maus binnen der 5 min mit der Erkundung der beiden Objekte verbrachte, wurde mit einem Videoüberwachungssystem aufgezeichnet, manuell ausgewertet und mit Hilfe des Diskriminationsindex (DI) (Abb. 2.6) miteinander verglichen.



B)

DI-Index:
$$\frac{t(\text{neues Objekt}) - t(\text{bekanntes Objekt})}{t(\text{neues Objekt}) + t(\text{bekanntes Objekt})}$$

Abbildung 2.6: 24 Hours Novel Object Recognition Task (24 h NORT) zur Analyse kognitiver Fähigkeiten.

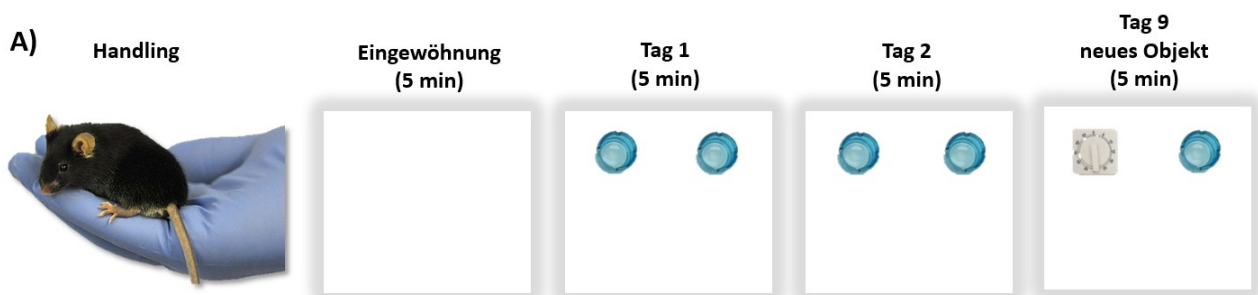
A) Die Mäuse werden zunächst gehandelt und an die leere Versuchsbox gewöhnt. An den Testtagen 1 und 2 werden jeder einzelnen Maus für 5 min zwei identische Objekte gezeigt (Lernphase). An Tag 3 wird eines der beiden Objekte gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht und jede Maus bekommt erneut für 5 min Zeit die Objekte zu erkunden (Testphase). Die Versuchseinheiten werden per Video aufgezeichnet.

(linke Abbildung: <http://www.procedureswithcare.org.uk/handling-and-restraint-of-the-animal/>)

B) Die Zeitspanne, die die Maus binnen der 5 min mit der Erkundung der beiden Objekte verbringt, wird gemessen und mit Hilfe des DI miteinander verglichen.

2.2.1.3.4 *Seven Days Novel Object Recognition Task (7 d NORT)*

Der 7 d NORT (Abb. 2.7) wurde genutzt, um die Gedächtniskonsolidierung zu studieren. Die Gedächtniskonsolidierung ist eine Gehirnfunktion, die auf die Projektionen zwischen dem HC, dem entorhinalen und dem präfrontalen Cortex beruht und somit zur Bildung des Langzeitgedächtnisses beiträgt (vergleiche 1.4). Die Versuchsdurchführung gleicht dem 24 h NORT (vergleiche 2.2.1.3.3), jedoch bekamen die Mäuse über zwei Tage zwei gleiche Objekte zu Gesicht, hatten dann über sieben Tage eine versuchsfreie Phase und erst an Versuchstag neun wurde den Tieren das schon bekannte und ein unbekanntes Objekt gezeigt. Die Zeitspanne, die die Maus binnen der 5 min mit der Erkundung der beiden Objekte verbrachte, wurde mit einem Videoüberwachungssystem aufgezeichnet, manuell ausgewertet und mit Hilfe des DI (Abb. 2.7) miteinander verglichen.



B)

DI-Index:

$$\frac{t(\text{neues Objekt}) - t(\text{bekanntes Objekt})}{t(\text{neues Objekt}) + t(\text{bekanntes Objekt})}$$

Abbildung 2.7: *Seven Days Novel Object Recognition Task (7 d NORT)* zur Analyse der Gedächtniskonsolidierung.

- A) Die Mäuse werden zunächst gehandelt und an die leere Versuchsbox gewöhnt. An den Testtagen 1 und 2 werden jeder einzelnen Maus für 5 min zwei identische Objekte gezeigt (Lernphase). Es folgt eine siebentägige versuchsfreie Phase. An Tag 9 wird eines der beiden Objekte gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht und jede Maus bekommt erneut für 5 min Zeit die Objekte zu erkunden. Die Versuchseinheiten werden per Video aufgezeichnet. (linke Abbildung: <http://www.procedureswithcare.org.uk/handling-and-restraint-of-the-animal/>)
- B) Die Zeitspanne, die die Maus während der 5 min mit der Erkundung der beiden Objekte verbringt, wird gemessen und mit Hilfe des DI miteinander verglichen.

2.2.1.3.5 Verhaltensexperimente für Expressionsstudien

Für die Expressionsstudien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, wurde der 24 h NORT (2.2.1.3.3) und der 7 d NORT (2.2.1.3.4) miteinander kombiniert. $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse und gleichaltrige Wildtypen (wt) wurden jeweils in drei Gruppen unterteilt. Allen Versuchstieren, der drei jeweiligen Gruppen wurden an Tag eins für 5 min zwei identische Objekte gezeigt (Lernphase). An Tag zwei wurden die Mäuse der $Tsc2^{+/-}$ -Gruppe eins und die der wildtypischen Kontrollgruppe eins 45 min nach der Lernphase über einen Genickbruch getötet. Die Gehirne wurden isoliert und in RNA *later* aufbewahrt (2.2.2.4). An Tag drei durchlief nur die $Tsc2^{+/-}$ -Gruppe zwei und die wildtypische Kontrollgruppe zwei den 24 h NORT. Eines der beiden Objekte, die bereits in der Lernphase präsentiert wurden, wurde gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht und jede Maus bekam erneut 5 min Zeit, um sich mit den Objekten zu beschäftigen. 45 min nach Beendigung des 24 h NORT wurden nur die Mäuse der $Tsc2^{+/-}$ -Gruppe zwei und die der wildtypischen Kontrollgruppe zwei über einen Genickbruch getötet. Die Gehirne wurden entfernt und in RNA *later* aufbewahrt (2.2.2.4). An Tag neun absolvierten die verbliebene $Tsc2^{+/-}$ -Gruppe Nummer drei und die wildtypische Kontrollgruppe Nummer drei den 7 d NORT. Eines der beiden Objekte, die bereits eine Woche zuvor während der Lernphase präsentiert wurden, wurde gegen ein unbekanntes Objekt ausgetauscht und jede Maus bekam erneut 5 min Zeit die Objekte zu erkunden. 45 min nachdem der 7 d NORT abgeschlossen war, wurde die $Tsc2^{+/-}$ -Gruppe drei und die wildtypische Kontrollgruppe drei über einen Genickbruch getötet, die Gehirne wurden ebenfalls isoliert und in RNA *later* eingelegt.

2.2.1.4 Tail Suspension (TS)

Bei der TS wird die Eigenschaft genutzt, dass Mäuse aktiv versuchen einem aversiven Stressreiz zu entkommen. Wehrt sich das Versuchstier nicht gegen eine unangenehme Situation, gilt dies als Selbstaufgabe und ist charakteristisch für einen depressiven Zustand. Für diesen Versuch wurde das Versuchstier für 6 min mit einem Klebeband am Schwanz fixiert und auf Video aufgezeichnet. Die Phasen der Immobilität, also der Selbstaufgabe wurden mit dem Computerprogramm EthoVision gesondert ausgewertet.

2.2.1.5 Sensorische Funktion

2.2.1.5.1 *Prepulse Inhibition (PPI)*

Die PPI wurde genutzt, um die sensorische Funktion beziehungsweise die Schreckreaktion einer Maus zu analysieren (Geyer et al., 2002). Das Versuchsvorhaben beruht auf dem Prinzip, dass ein gesundes Gehirn eine Filterfunktion für äußere Reize zeigt. Erfährt eine gesunde Maus einen Schreckreiz (Puls), antwortet sie mit einer bestimmten Muskelkontraktion und nachfolgend mit einem analysierbaren Schreckreflex. Wenn dem Schreckreiz (Puls) ein abgeschwächter Reiz (Präpuls) vorausgeht, ist die Schreckreaktion abgeschwächt, um eine Reizüberflutung des Gehirns vorzubeugen. Um den Schreckreflex aufzuzeichnen, wurde die Maus für 30 min in eine schalldichte Kammer gesetzt, die starke Bewegungen und Erkundungsverhalten verhindert. Die Bodensensoren der Kammer reagierten auf vertikale Vibrationen und produzierten eine messbare Spannung die proportional zur Bewegungsstärke der Maus war (Messsystem von Med Associates, USA). Nach einer zehnmütigen Eingewöhnungsphase bei 65 Dezibel (dB) Hintergrundrauschen folgten insgesamt 60 *trials* die sich randomisiert aus stimulifreien Phasen, aus nur Puls, aus nur Präpuls oder aus Präpuls mit Puls zusammen setzten. Die Intensität der akustischen Schreckreize (Puls) war 120 dB. Der Präpuls wurde 100 Millisekunden (ms) vor dem Puls mit einer Intensität von 70, 75 und 80 dB ausgelöst. Die PPI wurde als prozentuale Abnahme der Schreckreaktion angegeben.

2.2.1.6 Chronisch-sozialer Stress (CSS)

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein Modell (Abb. 2.8) etabliert, in dem transgene Mäuse psychisch-sozialem Stress ausgesetzt wurden. Für die Stressprozedur wurde die Versuchsm Maus in den Käfig eines größeren, stärkeren und aggressiveren CD1-Männchens gesetzt. Bei dem aggressiven CD1-Bock handelte es sich um eine Maus, welche bereits verpaart wurde und daraus resultierend ein natürliches aggressives Verhalten gegen männliche Artgenossen zeigte. Die Testmaus wurde von der CD1-Maus für circa 10 bis 20 Sekunden (sek) attackiert. Um Verletzungen zu verhindern, wurden die kämpfenden Mäuse dann umgehend voneinander getrennt, indem eine Trennwand in den Käfig eingeschoben wurde. Die Versuchsm Maus verweilte nun weitere 24 Stunden in dem abgetrennten Käfig der aggressiven Maus. Da die Trennwand mit Löchern versehen war, musste die zu testende Maus den Peiniger sehen und riechen, was zusätzlich sozialen Stress bedeutete. Um den Pegel an Stress zu intensivieren und aufrechtzuerhalten, wurde die Versuchsm Maus über 14 Tage jeden

Tag in den Käfig eines unbekanntes Aggressors gesetzt und von ihm bekämpft. Im Anschluss an die Stressprozedur wurden die gestressten Tiere einzeln in neue Käfige gesetzt und es folgte eine einwöchige Pause. Als Kontrollgruppe agierten ungestresste *Tsc2^{+/-}*-Mäuse und wildtypische Geschwistertiere, die über diese 14 Tage unberührt und einzeln sitzend in ihren Käfigen verweilten. Im Anschluss an die siebentägige Rekonvaleszenzphase durchliefen die chronisch gestressten Mäuse und deren Kontrollen eine Testbatterie aus SI, EPM, YM, PPI, TS und *nest building* (NB) und wurden dabei in ihrem Verhalten analysiert.

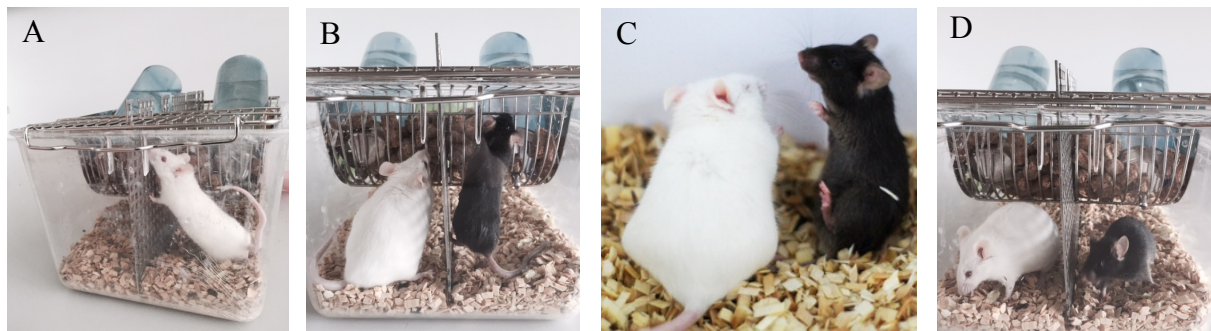


Abbildung 2.8: Chronisch-sozialer Stress (CSS)

- A) Der Käfig des aggressiven CD1-Bocks wird mit einer Trennwand in zwei Hälften getrennt.
 - B) Die Versuchsmouse wird separiert in den Käfig des aggressiven CD1-Bocks gesetzt.
 - C) Nach der Entfernung der Trennwand wird die Versuchsmouse von der aggressiven Maus für 10 bis 20 sek angegriffen (Abbildung: <https://www.mpg.de/6973945/stress-lernschwaecher>).
 - D) Der Kampf wird mittels einer Trennwand unterbrochen. Die Testmaus und Aggressor sitzen wieder separiert, können sich jedoch durch die gitterartige Trennwand sehen und riechen.
- Die Versuchsmouse wird über 14 Tage jeden Tag in den Käfig eines unbekanntes Aggressors gesetzt und von diesem angegriffen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Für alle angewandten molekularbiologischen Standardmethoden, wurde sich an die Methodensammlung von Sambrook und Russell (2001) gehalten.

2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Versuchstiere, die aus den unter Punkt 2.1.9.1 beschriebenen Zielverpaarungen resultierten, bekamen im Alter von circa zwei Wochen Schwanzbiopsien entnommen. Aus den Schwanzbiopsien wurde genomische *desoxyribonucleic acid* (DNA) isoliert, um in einem weiteren Schritt Genotypisierungen durchzuführen. Die DNA wurde zunächst mit dem NucleoSpin®Tissue Kit von Machery-Nagel (vergleiche 2.1.3) isoliert. Nach Optimierung der Methode wurde aus der Proteinase K-Stocklösung (vergleiche 2.1.2) eine 1:50 Verdünnung hergestellt. Aus dieser Verdünnung wurde 25 µl zu der Schwanzspitze pipettiert, die bereits mit 200 µl Verdauungspuffer (vergleiche 2.1.2) versetzt war. Der Ansatz wurde für drei bis 24 Stunden bei 56°C schüttelnd inkubiert und darauffolgend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 50 µl abgenommen und zu 100 µl Ampuva-Wasser pipettiert. Nach Resuspension wurde von diesem Ansatz wiederum 0,5 µl für die Standard-*polymerase chain reaction* (PCR) eingesetzt.

2.2.2.2 Standard-PCR

Die Standard-PCR ist eine enzymatisch gesteuerte Reaktion, die *in vitro* durchgeführt wird. Diese Methode wurde in der vorliegenden Dissertation genutzt, um definierte Sequenzen genomischer DNA, welche zum Zweck der Genotypisierung aus Schwanzspitzen isoliert wurde (vergleiche 2.2.2.1) zu amplifizieren. Der Reaktionsansatz für eine PCR besteht aus doppelsträngiger DNA, hitzestabilen DNA-Polymerasen, Nukleotiden und sogenannten *forward* und *reverse* Primern. Primer sind kurze synthetische Moleküle einzelsträngiger DNA, die komplementär zu den Enden der Ziel-DNA sind und somit die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren. Eine PCR wird durch sich wiederholende Zyklen gekennzeichnet, wobei ein Zyklus in drei Stadien eingeteilt wird. Während dem ersten Stadium erfolgt bei 95°C eine Hitzedenaturierung der DNA. Hierbei wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt. Im nächsten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung, wobei eine *annealing* Temperatur (T_A) gewählt wird, bei der das jeweilige Primerpaar optimal an ihre spezifische Basensequenz komplementär binden kann. Ein PCR-Zyklus endet damit, dass an das 3'-Ende eines jeden Primers Nucleotide angefügt werden und somit das DNA-Fragment synthetisiert

wird. Dieser Vorgang, der als Elongation bezeichnet wird, benötigt dafür die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) des Archaeobakteriums *thermus aquaticus*. Diese DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, jedoch keine Korrekturlesefunktion. Das Aktivitätsoptimum für die *Taq*-Polymerase liegt bei einer Temperatur von 72°C. Nachdem die Elongation abgeschlossen ist, beginnt ein neuer Zyklus, wobei jetzt jedes Produkt ebenfalls als DNA-Matrize dient. In Folge dessen steigt nach jedem Zyklus die DNA-Fragment-Menge exponentiell an.

Die Reaktionsansätze, welche für die hier durchgeführten PCRs vorbereitet wurden, stellten sich aus dem FastStart™ *Taq* DNA Polymerase-Kit (vergleiche 2.1.3) zusammen und bestanden somit aus 2,5 ul Reaktionspuffer, 0,5 ul Nukleotid-Mix und 0,4 ul Fast-Start-*Taq*-Polymerase. Dem Ansatz wurde 0,5 ul der doppelsträngigen DNA und jeweils 1 ul der zehnfach vorliegenden *forward* und *reverse* Primer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde mit Ampuwa-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 ul aufgefüllt. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die sich aus dem zuvor beschriebenen Reaktionsansatz zusammensetzte, der jedoch keine genomische DNA enthielt.

Für die Genotypisierungen der in dieser Arbeit eingesetzten Mäuse wurde das Protokoll von *The Jackson Laboratory*

(https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:0::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:9601,004686) verwendet.

Das Protokoll besagt, dass für die Genotypisierung einer Maus zwei PCRs durchzuführen sind. PCR 1 mit dem *Tsc2_com_r* -Primer und dem *Tsc2_wt_f* -Primer (vergleiche 2.1.8.1), um spezifisch eine wildtypische Region zu amplifizieren. PCR 2, welche mit den Primern *Tsc2_com_r* -Primer und dem *Tsc2_mut_f* -Primer (vergleiche 2.1.8.1) durchgeführt wurde, amplifizierte spezifisch die mutierte *Tsc2*-Region und bestimmte somit eindeutig eine *Tsc2*^{+/-}-Maus (Abb. 2.9).

Das für alle Genotypisierungsprimer optimierte PCR-Programm wird in Tabelle 2.14 zusammengefasst. Zur Kontrolle des PCR-Verlaufs wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 9 µl des PCR-Produkts mit 5 ul Ladepuffer (vergleiche 2.1.2) versetzt und auf ein 1,5 % iges Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 2.14: PCR-Programm für Genotypisierungen von <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mäusen	
1.	100°C
2.	94°C 3 min
3.	94°C 30 sek
4.	64°C 30 sek 35 x
5.	72°C 30 sek
6.	72°C 10 min
7.	4°C ∞

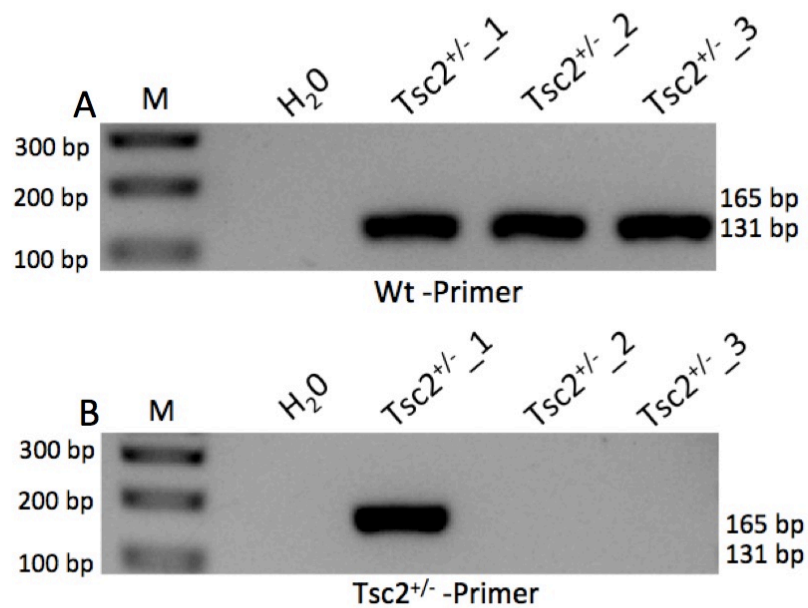


Abbildung 2.9: Exemplarische Genotypisierung nach gelelektrophoretischer Fragmentauftrennung der PCR-Produkte.

A) Die gelelektrophoretische Fragmentauftrennung der wt-PCR zeigt für alle drei zu analysierenden Mäuse eine Bande bei 131 bp.

B) Die gelelektrophoretische Fragmentauftrennung der *Tsc2*^{+/-}-PCR zeigt nur für die *Tsc2*^{+/-}-Maus eine zusätzliche Bande auf der Höhe von 165 bp.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Elektrophoreseverfahren, das zur Größenauftrennung von Nukleinsäuresträngen dient. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe und Konformation werden lange Fäden aus Agarosepolymeren durch Aggregation zu einem Gel vernetzt. Das Gel wird einer elektrischen Spannung ausgesetzt und besitzt somit eine Kathode und eine Anode. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich in dem Gel befinden. Die Nukleinsäuren wandern aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrates im elektrischen Feld zu der Anode. Je größer das DNA-Fragment ist, desto geringer ist die Wanderungsgeschwindigkeit im Agarosegel. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um heterozygote *Tsc2*-Mäuse von ihren wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden. Die Herstellung der Agarosegele erfolgte mit 1,5 g Agarose und 100 ml 1 x TAE-Puffer, die zusammen aufgeköcht wurden. Die aufgeköchte Lösung wurde mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten gegossen, welcher mit Kämmen ausgestattet war. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Kämmen entfernt. Über die hinterbliebenen Kammschlitze konnte das Agarosegel nun mit Proben beladen werden. Der gelelektrophoretische Lauf wurde 15 min bei 180 V durchgeführt. Nach Fragmentauftrennung der unter Punkt 2.2.2.2 beschriebenen PCRs entstand sowohl für einen Wildtypen als auch für eine *Tsc2*^{+/-}-Maus eine Bande bei 131 Basenpaaren (bp) und für eine *Tsc2*^{+/-}-Maus zeigte sich zusätzlich eine Bande auf der Höhe von 165 bp (Abb.2.9).

2.2.2.4 Isolation genomischer RNA aus Gehirngewebe

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde *ribonucleic acid* (RNA) aus Cortex, PFC, HC, DG und EC isoliert. Hierfür wurden zunächst die Gehirne in RNA *later* eingelegt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Gehirne wurden unter dem Binokular (Leica) präpariert, wobei für die EC-Präparation zusätzlich eine Gehirnmatrix (Roboz surgical store) und der *Allen Brain Atlas* genutzt wurde. Der Cortex wurde mit 200 µl Trizol versetzt. Für den PFC und den HC wurde lediglich 100 µl Trizol verwendet. Die jeweiligen Gehirnareale wurden mit Hilfe eines elektrischen Pelletmörser (Pellet pestles, blue polypropylene, Sigma-Aldrich) zerkleinert. Im Anschluss wurde das Trizolvolumen auf 1 ml aufgefüllt und durch vortexen eine homogene Suspension hergestellt, die über 5 min inkubiert wurde. Die Suspension wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und solange gevortext bis die Lösung rosa milchig war. Es folgte eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Für die Phasentrennung wurden die Proben für 20 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Die oberen, wässrigen

Phasen der zentrifugierten Proben wurden jeweils in 0,5 ml eiskaltes Isopropanol überführt. Die Lösungsgemische wurden leicht geschwenkt und 10 min bei RT inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13600 g und 4°C. Von jeder Probe wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde für 5 min bei 12000g und 4°C mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wurde wiederholt. Die weißlichen RNA-Pellets der jeweiligen Proben wurden so lange luftgetrocknet bis sie glasig erschienen. RNA-Pellets, die aus Cortex isoliert wurden, wurden in 200 µl RNA-freiem Wasser gelöst. RNA aus dem PFC und HC wurde in 30 µl RNA-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Isolationen aus dem DG und dem EC wurden mit dem High Pure RNA Tissue Kit von Roche (vergleiche 2.1.3) durchgeführt und in 10 µl RNA-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentrationsbestimmungen wurden über die Messung der optischen Dichte mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer von Marshall Scientific vorgenommen. Die Proben wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C eingefroren.

2.2.2.5 Reverse Transkription

Für die durchgeführten Expressionsanalysen wurde RNA in *complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA) umgeschrieben. Die Umschreibung, also die reverse Transkription (RT) erfolgte über das Enzym Reverse Transkriptase, welches eine RNA-abhängige DNA Polymerase ist und die Umschreibung von RNA zu cDNA katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der PrimeScript™ RT MasterMix von Takara (vergleiche 2.1.3) für die reverse Transkription verwendet. Hierfür wurden 50 bis 100 µg RNA mit 2 µl des Enzyms versetzt und mit RNA-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Die Umschreibung erfolgte über 15 min bei 37°C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase bei 85°C über 5 min inaktiviert (Tabelle 2.15). Der Ansatz wurde 1:10 mit RNA-freiem Wasser verdünnt und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiter verwendet.

Tabelle 2.15: Programm der reversen Transkription für die Umschreibung von RNA in cDNA

- | |
|---|
| 1. 37°C 15 min (RT) |
| 2. 85°C 5 min (Hitzeinaktivierung der RT) |
| 3. 4°C ∞ |

2.2.2.6 RT-qPCR

Genexpressionsanalysen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit quantitativ bestimmt. Eine *real-time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) ist eine Standard-PCR (vergleiche 2.2.2.2), in deren Verlauf die Menge an neugebildetem Produkt über Fluoreszenzfarbstoffe gemessen wird. Für die durchgeführten Expressionsanalysen wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen (SYBR® Premix Ex Taq™ II) verwendet, welcher nicht-kovalent, aber mit einer hohen Spezifität an die Oberfläche von doppelsträngiger DNA bindet und somit kontinuierlich die Produktneubildung nachweist. Für die RT-qPCR, die in dem StepOne Plus Real-Time System PCR Gerät von Applied Biosystems nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurde eine Multiwell-Platte von Biozym vorbereitet. Jedes zu analysierende Gen wurde in einem Tripletts charakterisiert. Pro Well wurde 1 bis 2 µg (2 ul) aus der unter Punkt 2.2.2.5 beschriebenen cDNA-Verdünnung eingesetzt. Hinzugefügt wurde 5 ul 2 x SYBR® Premix Ex Taq™ II, 0,2 ul *forward* Primer (10 x), 0,2 ul *reverse* Primer (10 x) und 2,6 µl RNA-freiem H₂O. Um eine relative Quantifizierung des zu untersuchenden Gens durchführen zu können, wurde das *housekeeping*-Gen *GAPDH* in jeder RT-qPCR mitgeführt. *Housekeeping*-Gene werden unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert. Das RT-qPCR-Programm ist in Tabelle 2.16 zusammengefasst. Die Auswertung der RT-qPCRs erfolgte über die Ermittlung des Schwellenwert-Zyklus (*Ct*-Wert). Der *Ct*-Wert ist eine theoretische Größe, die den Anfang einer exponentiell wachsenden Kurve beschreibt. Je mehr cDNA zu Beginn der RT-qPCR in einer Probe vorlag, desto mehr Kopien entstehen während dem Polymerisierungszyklus. Demzufolge wurde umso schneller ein Fluoreszenzsignal aufgezeichnet und der Benutzer- oder Programm-definierte Schwellenwert der Fluoreszenz schneller überschritten. Ein *Ct*-Wert ist umso kleiner, je mehr cDNA vorlag. Der Vergleich zweier Proben, die mit gleicher Effizienz amplifiziert wurden, konnte nun eindeutig zeigen, welche Probe vor der Amplifikation mehr DNA enthielt. Das Ergebnis ließ nun ein Vergleich der Genexpression zweier unterschiedlicher Gene zu.

Tabelle 2.16: Programm der RT-qPCR		
1.	95°C 30 sek	
2.	94°C 15 sek	
3.	60°C 30 sek	40 x
4.	72°C 30 sek	
5.	60°C 15 sek	
6.	95°C 15 sek	Schmelzkurve
7.	20°C 10 sek	

Nach Beendigung der RT-qPCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen, um die Qualität und Spezifität zu bestimmen. Für dieses Verfahren wurde die Temperatur kontinuierlich auf 95°C erhöht, wobei es zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA und in Folge dessen zum Freisetzen des Fluoreszenzfarbstoffs kommt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde gemessen und gab Aufschluss über ein Vorhandensein von Nebenprodukten. Spezifische Primer zeigten in der Auswertung ein Maximum der Fluoreszenzabnahme des Hauptprodukts. Lagen Nebenprodukte vor, wurden aufgrund der unterschiedlichen GC-Gehalte verschiedene Schmelzkurven sichtbar.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinlysatherstellung

Für die proteinbiochemischen Analysen die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, wurde zunächst der Cortex, der PFC und der HC mit einem Binokular (Leika) aus murinen Gehirnen präpariert und für 30 bis 60 min in RNA *later* eingelegt. Cortex, PFC und HC wurden mit 500 μ l *magic mix* (vergleiche 2.1.2) versetzt. Die jeweiligen Gehirnareale wurden mit Hilfe des elektrischen Pelletmörser (Pellet pestles, blue polypropylene, Sigma-Aldrich) zerkleinert. Im Anschluss wurde nur das *magic mix*-Volumen des Cortex auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden eine Stunde bei 4°C geschüttelt und im Anschluss über die QIAshredder-Säulen homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen wurden über die Messung der optischen Dichte mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer von Marshall Scientific bestimmt. Die Lysate wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode bei der über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese Proteine nach Molmasse aufgetrennt werden. SDS ist ein anionisches Tensid, welches über eine konstante Bindung proportional zum Molekulargewicht an das Protein (1 g Protein bindet 1,4 g SDS) zu einer konstanten negativen Ladungsverteilung führt. Die gegenseitige Ladungsabstoßung führt in Verbindung mit der Proteindenaturierung, welche durch Aufkochen und dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol herbeigeführt wird, zu einer Linearisierung des zuvor gefalteten Proteins. Die Linearisierung und die negativen Ladungseigenschaften der Proteine ermöglichen eine Kettenlängenauftrennung proportional zur Molekülmasse, da längere Proteine in einem SDS-Gel stärker zurückgehalten werden als kürzere.

Für die Versuchsdurchführung wurde zunächst ein Proteintrenngel (Tabelle 2.17) hergestellt. Das Trenngel wurde umgehend nach Herstellung bis zu der Trenngelmarkierung zwischen zwei Glasplatten gegossen, die in eine Gießvorrichtung von der Firma BioRad eingespannt waren. Um das Trenngel zu glätten wurde es mit 0,5 ml Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung des Trenngels wurde die Isopropanolbeschichtung abgeschüttelt und das Proteinsammelgel (Tabelle 2.17) auf das Trenngel gegossen. Ein Probenkamm mit 15 Taschen wurde auf das noch flüssige Sammelgel zwischen die Glasplatten gesteckt. Nach Aushärtung wurden die Glasplatten aus der Gießvorrichtung entfernt und in die Laufkammer

(BioRad) eingespannt. Die Laufkammer wurde mit 1 x Laemmli-Puffer aufgefüllt und die Probenkämme gezogen.

30 µg Proteinlysate wurde mit 2 x Proteinladepuffer auf ein Volumen von 15 µl gebracht und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Nach Abkühlen wurde die Probe auf das SDS-Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 200 V für 60 min.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Proteingele	
10 %iges Trenngel (5 ml)	
dH ₂ O	1,9 ml
1,5 M Tris pH 8,8 (Proteinpuffer I)	1,3 ml
Rotiphorese ^R Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	1,7 ml
SDS 10 %	50 µl
APS 10 %	50 µl
UltraPure TM Temed	2 µl
5 %iges Sammelgel (2 ml)	
dH ₂ O	1,15 ml
0,5 M Tris pH 6,8 (Proteinpuffer II)	500 µl
Rotiphorese ^R Gel 30 (Acrylamidstammlösung)	330 µl
SDS 10 %	20 µl
APS 10 %	20 µl
UltraPure TM Temed	2 µl

2.2.3.3 Western Blots

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren bei dem die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen (geblottet) werden. Auch bei dieser Methode wird ein elektrisches Feld genutzt, das senkrecht zum SDS-Gel gerichtet ist, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wandern und dabei auf die Trägermembran transferiert werden. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde für das Western Blot-Verfahren das vorgefertigte Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer System (vergleiche 2.1.3) und die Blotting-Maschine von BioRad verwendet. Der Proteintransfer wurde über 30 min bei 200 V durchgeführt. Bevor bestimmte Proteine auf der Membran über spezifische Antikörper detektiert werden konnten, wurden freie Bindungsstellen auf der Proteinmembran mit Blockingpuffer blockiert. Das Blocken erfolgte über eine Inkubation der Proteinmembran in antikörperspezifischem Blockingpuffer (5 %iges Milchpulver in PBST, 1 %iges BSA in PBST oder 5 %iges BSA in PBST) über eine Stunde, rollend und bei RT.

Nachdem freie Bindungsstellen auf der Membran geblockt waren, folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C, rollend und über Nacht. Die Verdünnung des jeweiligen primären Antikörpers wurde den Angaben des Herstellers entnommen. Am darauffolgenden Tag wurde die Proteinmembran dreimal über je 5 min mit PBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Horseradishperoxidase (HRP)-konjugiertem Antikörper über 30 min rollend und bei RT inkubiert. Die Verdünnung des jeweiligen sekundären Antikörpers wurde ebenfalls den Angaben des Herstellers entnommen. Im Anschluss wurde die Proteinmembran erneut dreimal über je 5 min mit PBST gewaschen. Die Membran wurde nachfolgend in eine Plastiktasche gesteckt und mit dem Western Lightning^R Plus-ECL-Detektionsreagenz behandelt. Die Chemolumineszenz wurde mittels dem Las-3000 von Fujifilm detektiert.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde vorwiegend der Fokus auf das Studium der Phänotypentwicklung und auf die Charakterisierung der molekularen Mechanismen der TS gesetzt. Dabei wurde zunächst die Frage geklärt, ob das für diese Dissertation verwendete konstitutive $Tsc2^{+/-}$ -Mausmodell kognitive Defizite und autistische Verhaltensmuster entwickelt und somit die neurologischen Symptome von TS-Patienten nachstellt. Der Hypothese zur Folge, dass die Entwicklung neurologischer Symptome in TS-Patienten ein gradueller, progressiver Prozess ist, wurden die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse in unterschiedlichen Altersgruppen in Verhaltensbatterien analysiert, die zum einen die kognitive Leistung und zum anderen autistische Verhaltensmuster messen. Darüber hinaus durchliefen die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse verschiedene Verhaltenstests nachdem sie CSS ausgesetzt wurden.

Um die biochemischen Mechanismen betroffener Gehirnregionen der $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse zu untersuchen, wurden sowohl Proteinanalysen, als auch Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen IEGs durchgeführt.

3.1 Verhaltensexperimente mit $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen

3.1.1 Sozialverhalten

Um das Sozialverhalten beziehungsweise einen möglichen autistischen Phänotypen von $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen zu studieren, wurde sowohl die soziale Interaktion (vergleiche 2.2.1.1.1) der Versuchstiere getestet, als auch die Fähigkeit ein ordentliches Nest zu bauen (vergleiche 2.2.1.1.2) analysiert.

3.1.1.1 *Social Interaction (SI)*

Der SI-Test (vergleiche 2.2.1.1.1) wurde angewandt, um den Umgang von zwei Mäusen miteinander zu studieren. Das Experiment untergliederte sich in Habituation und Testphase. Für die Habituation befand sich ein leerer Maschendraht-Zylinder in der virtuellen Interaktionszone der weißen Versuchsbox. Für die Testphase wurde eine für die Testmaus fremde Maus in den Maschendraht-Zylinder gesetzt. Die Zeit, die die zu untersuchende Maus sowohl während der Habituation als auch während der Testphase in der Interaktionszone verbrachte, wurde gemessen.

Die Auswertung der SI (Abb.3.1) von zwei Monate alten Mäusen zeigte keine Unterschiede zwischen $Tsc2^{+/-}$ -Tieren und der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Der Test wurde ebenfalls mit Mäusen durchgeführt, die vier Monate alt waren. Während die Wildtypen mit einer für sie unbekanntem Maus einen SI-Index von 100 zeigten, ist das Sozialverhalten der vier Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere um 25 SI-Indexpunkte signifikant vermindert.

3.1.1.2 Nest Building (NB)

Gleiches spiegelte sich bei der Bewertung der Nestbauqualität (Abb. 3.2) wider. Das Nestbauverhalten (vergleiche 2.2.1.1.2) ist ein weiterer Test, um das Sozialverhalten einer Maus zu analysieren. Für das Experiment wurde den einzeln sitzenden Mäusen ein Nestlet in den Käfig gelegt. 24 Stunden später wurden die erbauten Nester anhand des Gewichts der nicht verwendeten Nestletreste und einer Bewertungsskala (Deacon, 2006) bewertet.

Sowohl das Nest der zwei Monate alten Wildtypen als auch das Nest der zwei Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere wurde mit einer Rangnummer von vier bewertet. Ebenfalls verwendeten beide Gruppen binnen 24 Stunden durchschnittlich 2 g von ursprünglich circa 2,5 g Nestmaterial für den Nestbau. Der Vergleich zwischen vier Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere und den gleichaltrigen Wildtypen zeigte hingegen signifikante Unterschiede in der Qualität des gebauten Nests. Während vier Monate alte Wildtypen das gleiche Nestbauverhalten wie die zwei Monate alten Gruppen aufwiesen, nutzten die vier Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere signifikant weniger Nestbaumaterial und wurden mit einer signifikant geringeren Rangnummer von 2,5 bewertet. Zusammenfassend zeigten Verhaltensexperimente, die das soziale Verhalten beschreiben, dass zwei Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse noch keine Defizite im sozialen Verhalten aufweisen. Vier Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse verbringen hingegen signifikant weniger Zeit mit einem unbekanntem Interaktionspartner und zeigten zudem ein defizitäres Nestbauverhalten.

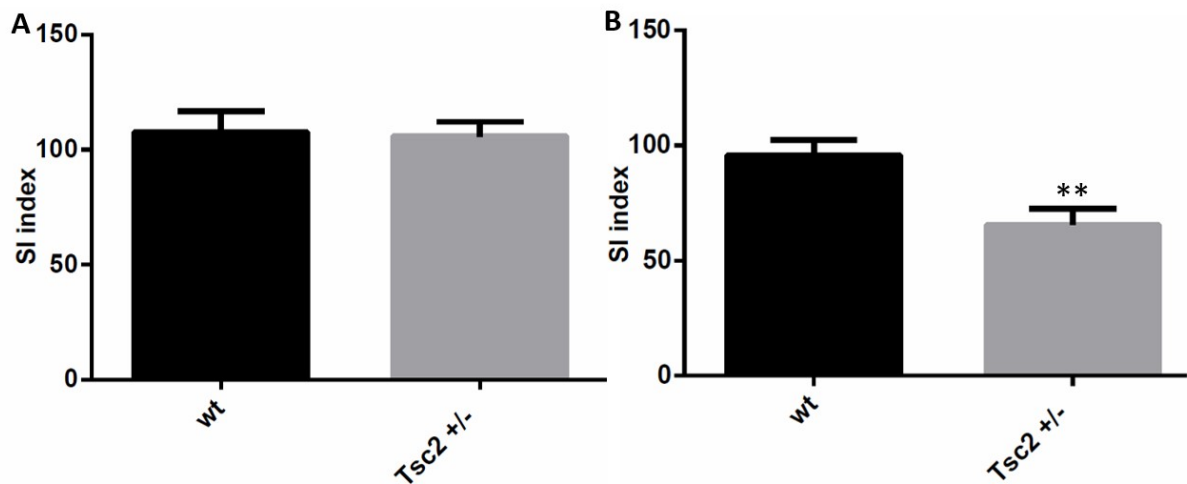


Abbildung 3.1: Social Interaction (SI) in einer 2,5-minütigen Testperiode.

- A) 2 m alte wt und $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse zeigen keine Defizite im sozialen Verhalten mit einem fremden Interaktionspartner. (2 m wt: n = 17, 2 m $Tsc2^{+/-}$: n = 20; 2 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9816; Mann-Whitney-U-Test)
- B) 4 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere verbringen im Vergleich zu der gleichaltrigen Kontrollgruppe signifikant weniger Zeit mit einem unbekanntem Interaktionspartner. (4 m wt: n = 19, 4 m $Tsc2^{+/-}$: n = 19; 4 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0064; Mann-Whitney-U-Test)

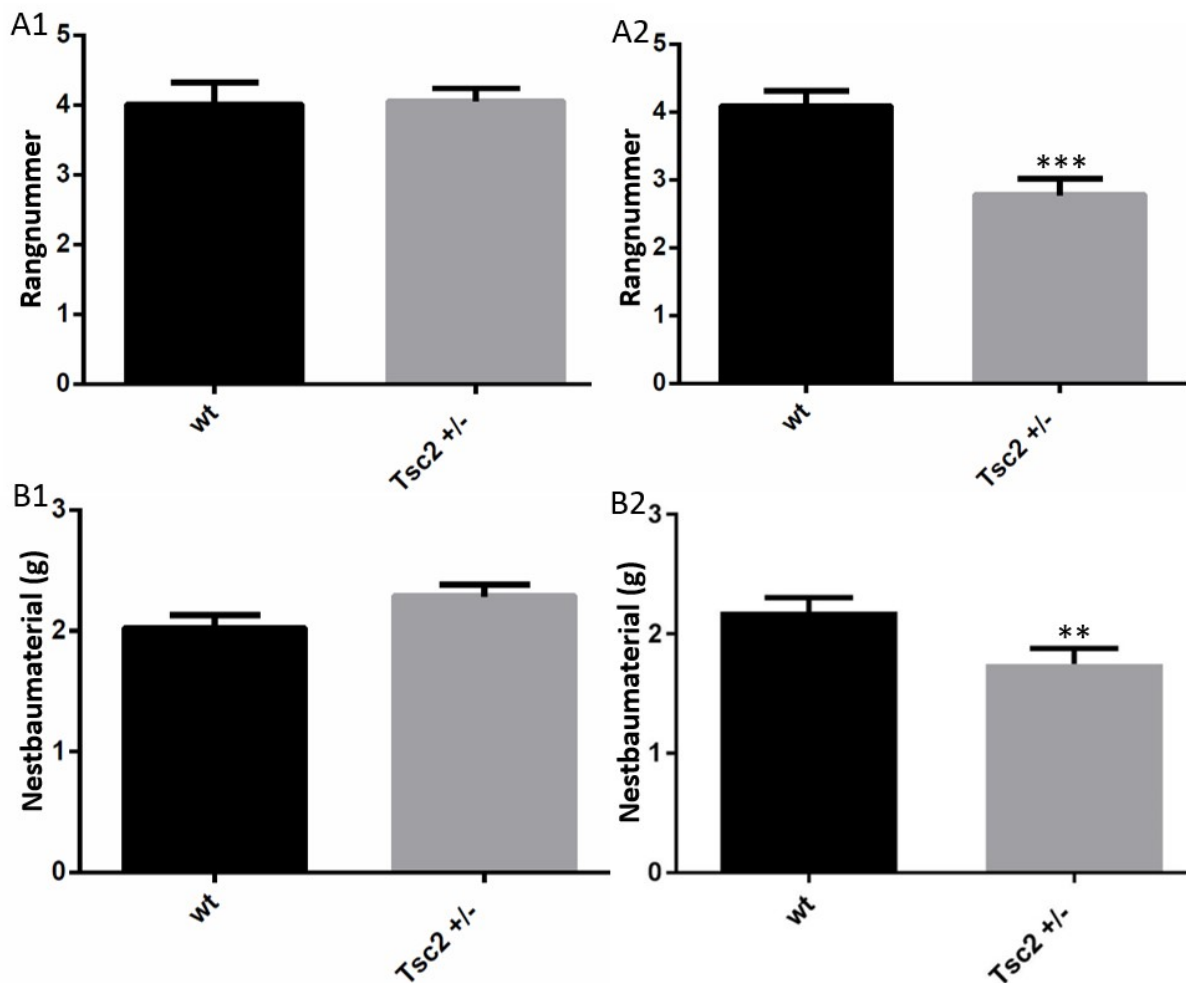


Abbildung 3.2: Bewertung des Nestbaus zur Beurteilung des Sozialverhaltens.

- A) Nester werden anhand einer Bewertungsskala von eins bis fünf bewertet. Mit einer Rangnummer von vier bauen 2 m alte wt und *Tsc2*^{+/-}-Mäuse ihr Nest (A1). 4 m alte wt bauen ihr Nest ebenfalls mit einer Rangnummer von vier und 4 m alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere werden hingegen mit einer Rangnummer von 2,5 bewertet und bauen ihr Nest somit signifikant uneffizienter als die gleichaltrigen wt (A2). (A1: 2 m wt: n = 17; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 20; 2 m wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,4901; A2: 4 m wt: n = 19; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 19; wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,003; Mann-Whitney-U-Test)
- B) Sowohl die wt und die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Alter von 2 m (B1), als auch die 4 m alten wt verwenden mehr Nestletmaterial als die 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere (B2). (B1: 2 m wt: n = 17; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 20; 2 m wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0512; B2: 4 m wt: n = 19; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 19; wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0057; Mann-Whitney-U-Test)

3.1.2 Angstverhalten

3.1.2.1 *Elevated Plus Maze (EPM)*

Der EPM-Test wurde durchgeführt, um das Angstverhalten von $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen zu studieren. Für dieses Versuchsvorhaben wurde die Testmaus in eine plusförmige Vorrichtung mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen gesetzt (vergleiche 2.2.1.2.1). Es ist davon auszugehen, dass ein erhöhter Aufenthalt in den geschlossenen Armen im Vergleich zu den offenen auf eine erhöhte Ängstlichkeit der zu untersuchenden Maus hinweist. Die Ergebnisse zeigten, dass sich vier Monate alte Wildtypen (Abb. 3.3 B) in einer 300-sekündigen Testphase für 60 sek in den offenen Armen der Apparatur aufhielten. Gleichaltrige $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse (Abb. 3.3 B) verbrachten hingegen nur 30 sek, also weniger Zeit in den offenen Bereichen. Ebenso verweilten die zwei Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere und deren Kontrollgruppe (Abb. 3.3 A) nur 30 sek lang in den offenen Armen. Als Resultat lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass vier Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse ein vergleichbares Angstverhalten wie beide Gruppen der zwei Monate alten Tiere zeigten. Vier Monate alte Wildtypen zeigten ein geringeres Angstverhalten im Vergleich zu den gleichaltrigen $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen, was jedoch statistisch nicht als signifikant einzuordnen war.

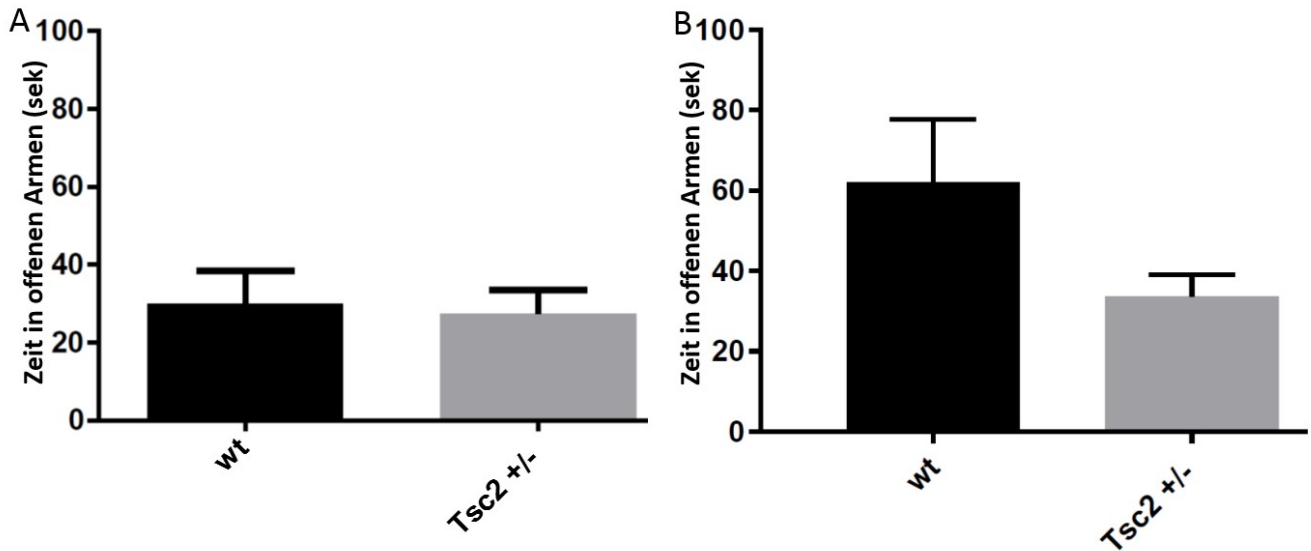


Abbildung 3.3: Angstverhalten im *Elevated Plus Maze* (EPM) in einer 300-sekündigen Testperiode.

- A) 2 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere und deren Kontrollgruppe verbringen 30 sek in den offenen Bereichen der Testapparatur. (2 m wt: n = 17, 2 m $Tsc2^{+/-}$: n = 20; wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,8898; Mann-Whitney-U-Test)
- B) Ebenso verweilten 4 m $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse 30 sek lang in den offenen Armen. Die gleichaltrigen wt hielten sich hingegen 60 sek in den offenen Armen auf. (4 m wt: n = 19, 4 m $Tsc2^{+/-}$: n = 18; wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,5585; Mann-Whitney-U-Test)

3.1.3 Testung der kognitiven Leistung

3.1.3.1 *Spontaneous Alternation in Y maze* (YM)

Um die Entwicklung einer möglichen kognitiven Störung in einem heterozygoten *Tsc2*-Modell zu studieren, wurde das Hippocampus-basierende YM durchgeführt. Für dieses Versuchsvorhaben wurde die Testmaus in ein Labyrinth mit drei geschlossenen Armen gesetzt (vergleiche 2.2.1.3.1). Typischerweise erforschen Mäuse neue Umgebungen und bevorzugen aus dieser Bereitschaft heraus neue Bereiche des Labyrinths. Die Maus musste sich also erinnern, welcher Arm des Labyrinths schon erkundet wurde und entscheiden, welcher Arm als nächstes besucht wird. Der Versuch wurde mit zwei Monate alten und mit vier Monate alten Versuchsmäusen durchgeführt. Die Auswertung der spontanen Richtungswechsel, die in einer zehnminütigen Testperiode aufgezeichnet wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen der zwei und vier Monate alten Mäuse. Die zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und deren gleichaltrige Kontrollgruppe zeigten spontane Richtungswechsel von 57 %, vier Monate alte heterozygote *Tsc2*-Mäuse und deren wildtypische Kontrollgruppe präsentierten spontane Richtungswechsel von 60 % (Abb. 3.4 A und B).

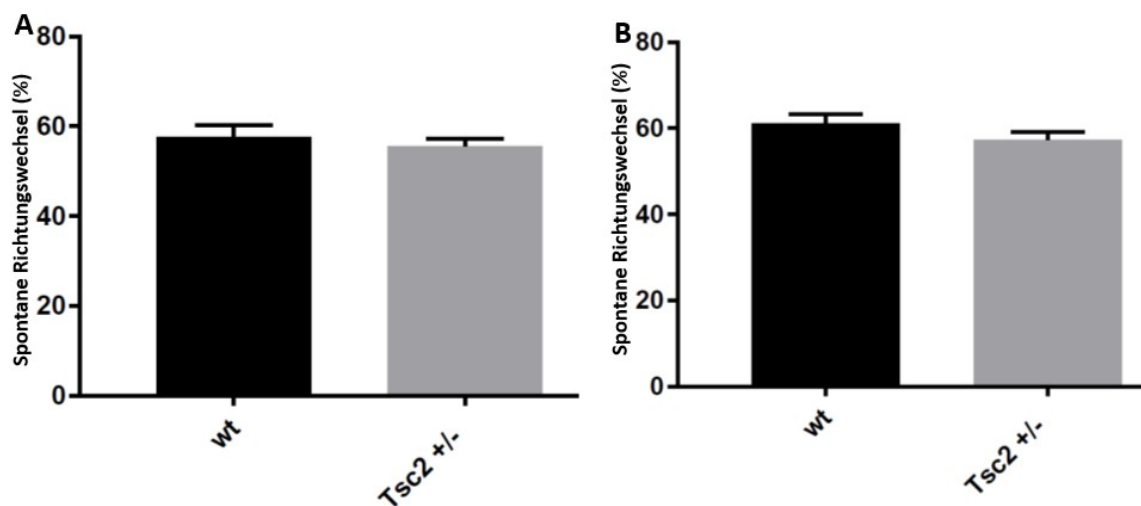


Abbildung 3.4: *Spontaneous Alternation in Y maze* (YM) in einer zehnminütigen Testphase.

A), B) Sowohl 2 m alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und deren Kontrollen (A) als auch die 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und deren Kontrollen (B) zeigen keine signifikanten Unterschiede der spontanen Richtungswechsel. (A: 2 m wt: n = 12, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 13; 2 m wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,4768; B: 4 m wt: n = 15; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 15; 4 m wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,3994; Mann-Whitney-U-Test)

3.1.3.2 *Morris Water Maze (MWM)*

Um weitere Studien über eine mögliche Entwicklung einer kognitiven Beeinträchtigung in einem $Tsc2^{+/-}$ -Mausmodell durchzuführen, wurde das Hippocampus-basierende MWM genutzt. Mäuse empfinden Schwimmen als unangenehm und versuchen diesem Verhalten zu entkommen. Diese natürliche Aversion wird bei dem in dieser Doktorarbeit vorgestellten MWM ausgenutzt. In einem über zwei (visuelles MWM) beziehungsweise acht Tage (verstecktes MWM) andauernden Test wurde die Versuchsmaus in einem Schwimmbecken schwimmen gelassen. Das Tier sollte in der ersten Trainingsphase (visueller MWM) zunächst lernen eine mit einer Fahne markierte Plattform zu finden und auf diese zu klettern. Für die zweite Trainingsphase (verstecktes MWM) befand sich die Plattform unter der Wasseroberfläche und die Fahne wurde entfernt. Das Versuchstier musste sich nun merken in welchem Quadrant die Plattform zu finden war. Zur Orientierung wurden seitlich des Schwimmbeckens ausgeprägte Markierungen, sogenannte externe Hinweisreize angebracht (vergleiche 2.2.1.3.2). Der Versuch wurde mit vier Monate alten Versuchstieren durchgeführt und vier Monate später, also in einem Alter von acht Monaten wiederholt. Damit die acht Monate alten Mäuse die Orientierung im Schwimmbecken komplett neu erlernten, wurden die externen Hinweisreize, die seitlich am Beckenrand angebracht waren gegen andere Markierungen ausgetauscht und die Plattform wurde in den gegenüberliegenden Quadranten platziert. Während des zweitägigen visuellen MWM lernten beide Gruppen der vier und acht Monate alten Tiere die Plattform zu finden und zu erklimmen. Die vier Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere als auch die gleichaltrige Kontrollgruppe brauchten dafür an Tag eins 40 sek und legten 800 cm zurück. Am darauffolgenden Trainingstag erreichten beide Gruppen in 10 sek und mit einer zurückgelegten Strecke von 200 cm signifikant schneller die sichtbare Plattform (Abb. 3.5 A1a, A1b). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich in dem achttägigen versteckten MWM. An Tag eins erreichten die vier Monate alten Versuchstiere binnen 40 sek die unsichtbare Plattform und legten dabei eine Strecke von 1000 cm zurück. An dem finalen Trainingstag acht erreichten die zu analysierenden Mäuse die versteckte Plattform in 20 sek mit einer zurückgelegten Strecke von 300 bis 400 cm (Abb. 3.5 A2a, A2b).

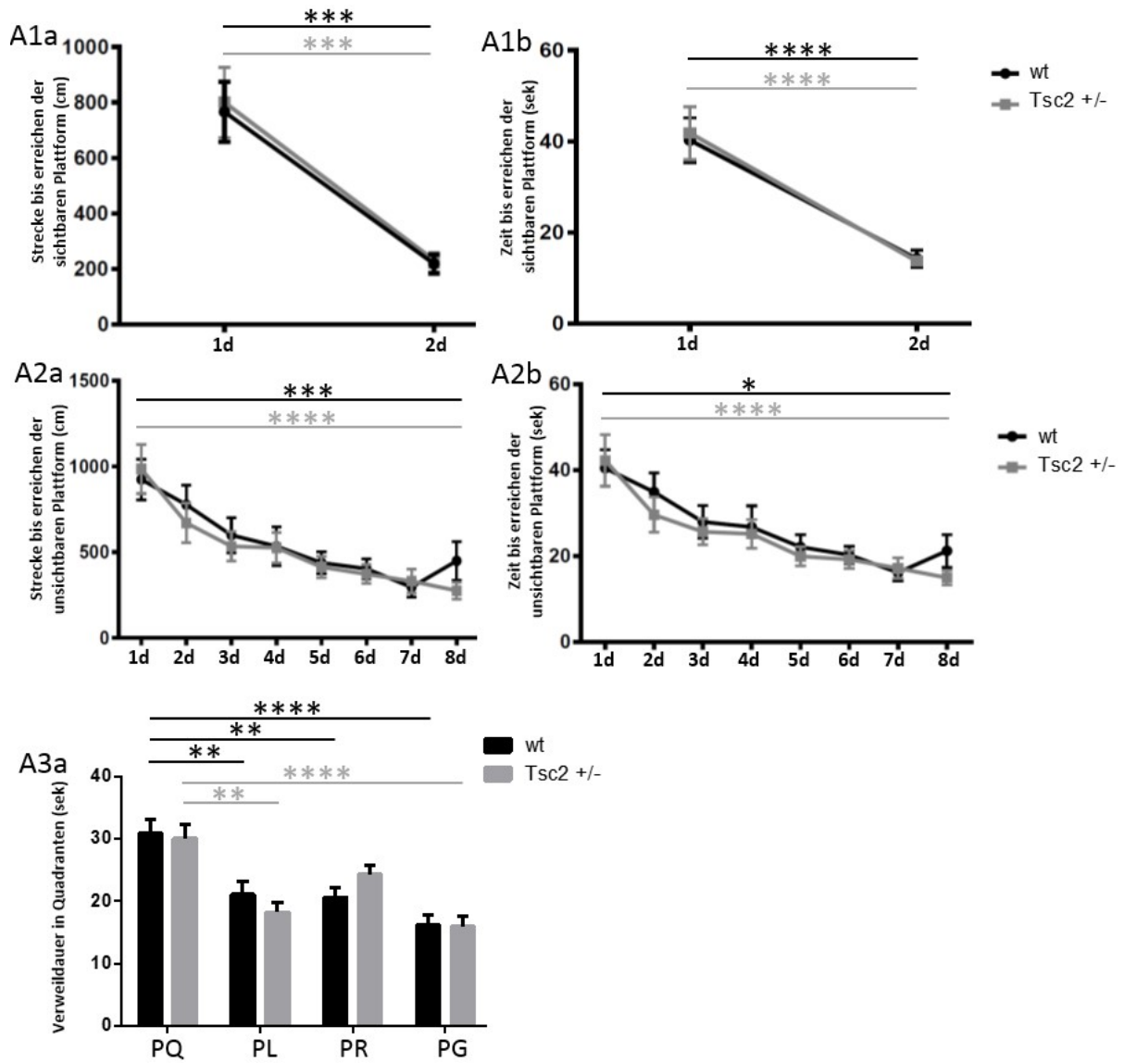
Acht Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere und die gleichaltrige Kontrollgruppe erlernten ebenfalls sowohl das visuelle, als auch das versteckte MWM, wobei die heterozygoten $Tsc2$ -Tiere in beiden Trainingseinheiten schneller performten. An Tag eins des visuellen MWM legten die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse 225 cm bis zum Erreichen der Plattform zurück. Die wildtypische Kontrollgruppe erreichte die sichtbare Plattform erst nach 300 cm und legten somit einen signifikant längeren Weg zurück als die $Tsc2^{+/-}$ -Tiere. An Tag zwei legten beide Gruppen 125

cm zurück, um die sichtbare Plattform zu erreichen (Abb. 3.5 B1a). Diesen Ergebnissen entsprach auch die Zeit die zum Erreichen der sichtbaren Plattform aufgebracht wurde. Die *Tsc2^{+/-}*-Gruppe suchte an Tag eins die Plattform in 6 sek auf und an Tag zwei in 3 sek. Für die wildtypische Kontrollgruppe wurde an Tag eins 8 sek und an Tag zwei 5 sek aufgezeichnet, die Kontrollgruppe brauchte somit signifikant mehr Zeit zum Erreichen der sichtbaren Plattform (Abb. 3.5 B2a).

Gleiches spiegelte sich in dem versteckten MWM wider. Sowohl die acht Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Tiere als auch die gleichaltrige Kontrollgruppe benötigten über die achttägige Trainingsphase von Tag zu Tag signifikant weniger cm bis zum Erreichen der versteckten Plattform (Abb. 3.5 B2a). Die Zeit bis zum Erreichen der Plattform nimmt von Tag zu Tag für beide Gruppen der acht Monate alten Tiere ebenfalls ab, wobei hier nur für die *Tsc2^{+/-}*-Mäuse ein signifikantes Ergebnis verzeichnet wird (Abb. 3.5 B2b). Acht Monate alte *Tsc2^{+/-}*-Mäuse erzielten an Tag eins binnen 18 sek und mit einer Strecke von 650 cm die unsichtbare Plattform. An Tag acht retteten sie sich binnen 8 sek mit einer Strecke von 180 cm auf die Plattform. Die acht Monate alte wildtypische Kontrollgruppe legte an Tag eins eine Strecke von 800 cm in 20 sek zurück, um die Plattform zu erreichen. An dem finalen Trainingstag erreichten die Tiere die Plattform in 12 sek und einer zurückgelegten Strecke von 300 cm und brauchte somit mehr Strecke und Zeit als die gleichaltrige Vergleichsgruppe.

Nach zehn Tagen Training wurde die Plattform aus dem Quadranten PQ entfernt. In einer 90-sekündigen Testperiode hielten sich sowohl die vier Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Mäuse, als auch die vier Monate alten Wildtypen 30 sek länger in dem Plattformquadranten, als in den drei anderen Quadranten auf. Vier Monate später, also im Alter von acht Monaten, verweilten ebenfalls beide Gruppen 1/3 der Zeit in dem Plattformquadranten, also länger als in den drei anderen Bereichen (Abb. 3.5 B3a). 16 Tage später wurde nur die Testphase unter den gleichen Bedingungen, folglich mit denselben externen Hinweisreizen wiederholt. Das Ergebnis zeigte, dass sich sowohl die *Tsc2^{+/-}*-Mäuse, als auch die Wildtypen an die Markierungen erinnerten und signifikant mehr Zeit in dem Plattformquadranten verbrachten (Abb. 3.5 B3b).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Doktorarbeit mit dem Hippocampus-basierenden MWM gezeigt werden, dass vier Monate alte *Tsc2^{+/-}*-Mäuse und deren Kontrollgruppe während der Trainingsphase vergleichbare Lernerfolge erzielten. Im Alter von acht Monaten performten heterozygote *Tsc2*-Mäuse im Vergleich zu der gleichaltrigen Kontrollgruppe schneller. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Ehninger et al., 2008) konnte die finale Testphase des MWM für beide Altersgruppen keine Unterschiede zwischen *Tsc2^{+/-}*-Mäusen und deren Kontrollgruppen aufzeigen.



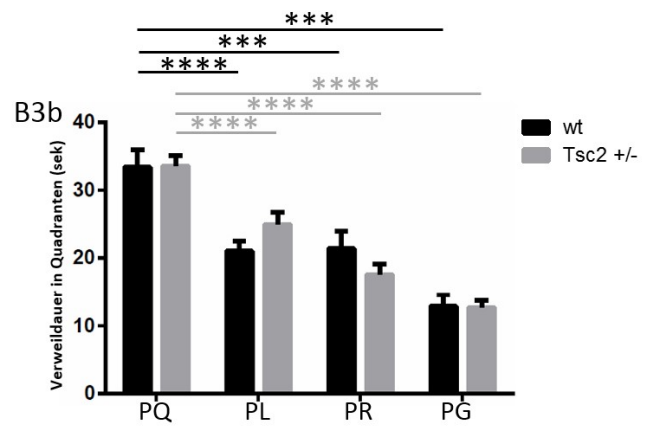
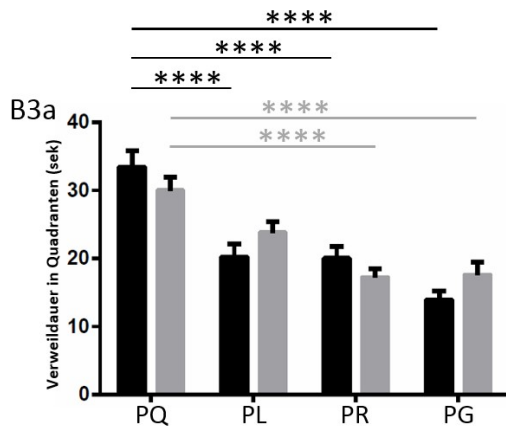
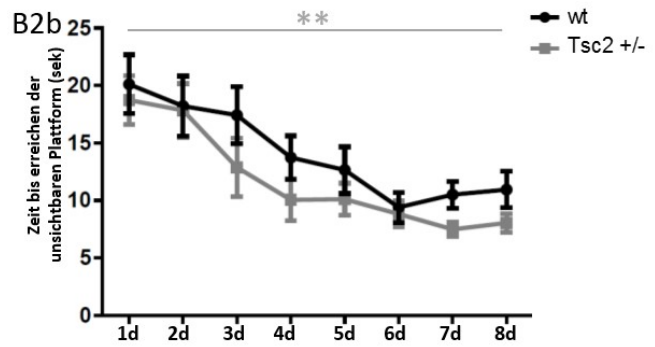
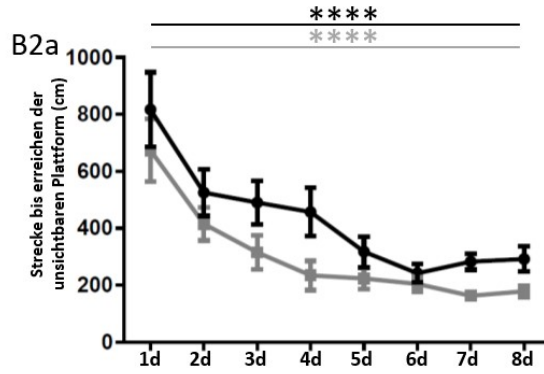
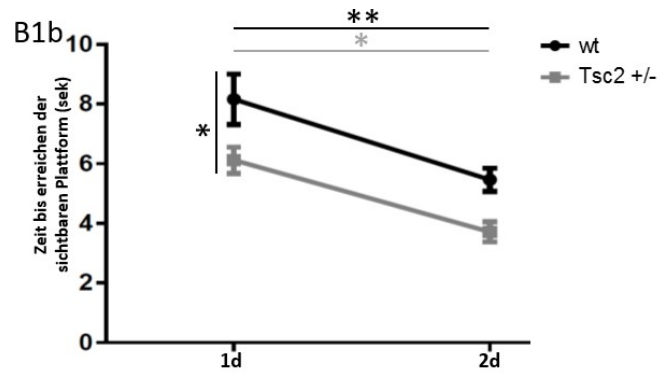
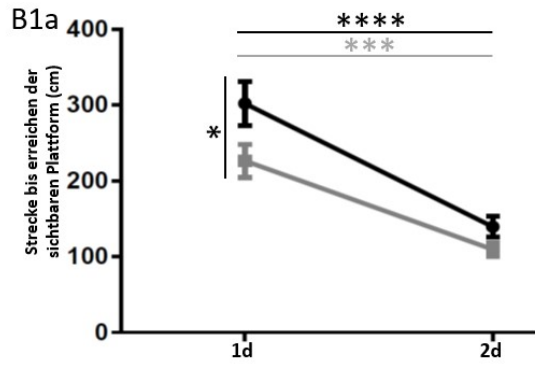


Abbildung 3.5: Morris Water Maze (MWM) zur Analyse der hippocampalen Gedächtnisfunktion.

- A) 4 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse und die gleichaltrige Kontrollgruppe benötigen sowohl in dem visuellen MWM (A1), als auch in dem verdeckten MWM (A2) von Tag zu Tag weniger cm und erreichen die Plattform von Tag zu Tag schneller. Während der Testphase an Tag zehn (A3) verbringen beide Gruppen mehr Zeit in dem Plattformquadranten. (4 m wt: n = 14; 4 m $Tsc2^{+/-}$: n = 14; A1a: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9920; Tag 1 wt/ Tag 2 wt: p = 0,0002; Tag 1 wt/ Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0003; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 wt: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0002; Tag 2 wt/Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9995; A1b: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9921; Tag 1 wt/ Tag 2 wt: p = < 0,0001; Tag 1 wt/ Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 wt: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; Tag 2 wt/Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9997; A2a: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = > 0,999; Tag 8 wt/Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9948; Tag 1 wt/Tag 8 wt: p = 0,0279; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; A2b: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,9999; Tag 8 wt/Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9972; Tag 1 wt/Tag 8 wt: p = 0,0119; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; A3a: PQ wt/ PQ $Tsc2^{+/-}$: p = > 0,999, PQ wt/PL wt: p = 0,0034, PQ wt/PL $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL wt: p = 0,0068, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0001; PQ wt/PR wt: p = 0,0019, PQ wt/PR $Tsc2^{+/-}$: p = 0,1255, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR wt: p = 0,0039, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR $Tsc2^{+/-}$: p = 0,1855; PQ wt/PG wt: p = < 0,0001, PQ wt/PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG wt: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001. B1a: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0451; Tag 1 wt/ Tag 2 wt: p = < 0,0001; Tag 1 wt/ Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 wt: p = 0,0166; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0007; Tag 2 wt/Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,7076; ANOVA-Test mit anschließendem *Tukay's Multiple Comparisons-Test*)
- B) 8 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse und die gleichaltrige Kontrollgruppe erreichen sowohl in dem visuellen MWM (B1), als auch in dem verdeckten MWM (B2) von Tag zu Tag schneller die Plattform und legen von Tag zu Tag weniger Strecke zurück. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe performen die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse schneller. Während der Testphase an Tag zehn (B3a) und Tag 26 (B3b) verbringen beide Gruppen mehr Zeit in dem Plattformquadranten. (8 m wt: n = 14; 8 m $Tsc2^{+/-}$: n = 14; B1b: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0494; Tag 1 wt/ Tag 2 wt: p = 0,0050; Tag 1 wt/ Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 wt: p = 0,8289; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0148; Tag 2 wt/Tag 2 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,1172. B2a: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9745; Tag 8 wt/Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9977, Tag 1 wt/Tag 8 wt: p = < 0,0001; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = > 0,0001. B2b: Tag 1 wt/Tag 1 $Tsc2^{+/-}$: p = > 0,9999; Tag 8 wt/Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,9994, Tag 1 wt/Tag 8 wt: p = 0,0533; Tag 1 $Tsc2^{+/-}$ /Tag 8 $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0079. B3a: PQ wt/ PQ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,8873, PQ wt/PL wt: p = < 0,0001, PQ wt/PL $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0065, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL wt: p = 0,0002, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0164; PQ wt/PR wt: p = < 0,0001, PQ wt/PR $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR wt: p = 0,0050, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; PQ wt/PG wt: p = < 0,0001, PQ wt/PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG wt: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001. B3b: PQ wt/ PQ $Tsc2^{+/-}$: p = > 0,9999, PQ wt/PL wt: p = 0,0002, PQ wt/PL $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0369, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL wt: p = 0,0002; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PL $Tsc2^{+/-}$: p = 0,00292; PQ wt/PR wt: p = 0,0004; PQ wt/PR $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR wt: p = 0,0003, PQ $Tsc2^{+/-}$ /PR $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; PQ wt/PG wt: p = < 0,0001, PQ wt/PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG wt: p = < 0,0001; PQ $Tsc2^{+/-}$ /PG $Tsc2^{+/-}$: p = < 0,0001; *two-way ANOVA-Test mit anschließendem Tukay's Multiple Comparisons-Test*)

3.1.3.3 24 Hours Novel Object Recognition Task (24 h NORT)

Die Analysen des 24 h NORT untermauerten die Ergebnisse des MWM. Der 24 h NORT (vergleiche 2.2.1.3.3) findet in einer Versuchsbox statt, in der den Versuchsmäusen über zwei Tage zwei identische Objekte gezeigt werden (Lernphase). Am Tag drei wird eines der beiden Objekte gegen ein unbekanntes ausgetauscht (Testphase). Dieser Versuch basiert also auf dem Vorhaben, dass Mäuse Objekte wiedererkennen und zwei unterschiedliche Objekte voneinander unterscheiden sollen. Somit lässt dieser Verhaltensversuch ebenfalls die Analyse von kognitiven Fähigkeiten zu.

Sowohl für drei Monate, als auch für acht Monate alte Mäuse wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen gezeigt (Abb. 3.6 A1). Die Lernphase wurde für drei Monate alte Tiere mit dem Objekt „Stoppuhr“ durchgeführt. Die Mäuse erinnerten sich nach 24 Stunden an die schon bekannte Stoppuhr und interessierten sich mehr für das unbekannte Objekt, den Aschenbecher. Beide Gruppen zeigten einen altersabhängigen DI von 0,3. Fünf Monate später wurde der Versuch mit zwei neuen unbekanntem Objekten wiederholt (Abb.3.6 B1). Die Lernphase wurde hier mit einem Eierbecher durchgeführt. Nach 24 Stunden erinnerten sich beide Gruppen an den Eierbecher und verbrachten mehr Zeit mit der noch unbekanntem Taschenlampe. Beide Gruppen zeigten hier einen altersabhängigen DI von 0,5. Zudem konnten für beide Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrigen Kontrollgruppen in der Auswertung der Explorationszeit gefunden werden (Abb. 3.6 A2 und B2). Die Explorationszeit beschreibt die Zeit, die die Mäuse in Summe mit beiden Objekten verbrachten. Versuchstiere, die eine Explorationszeit von unter 15 sek zeigten, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen (Bilsland et al., 2008; Ennaceur and Delacour, 1988; Langston and Wood, 2010). Der 24 h NORT, welcher in der vorliegenden Arbeit herangezogen wurde, um die kognitiven Fähigkeiten des heterozygoten *Tsc2*-Mausmodells zu studieren, zeigte sowohl im Alter von drei als auch im Alter von acht Monaten keine Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion.

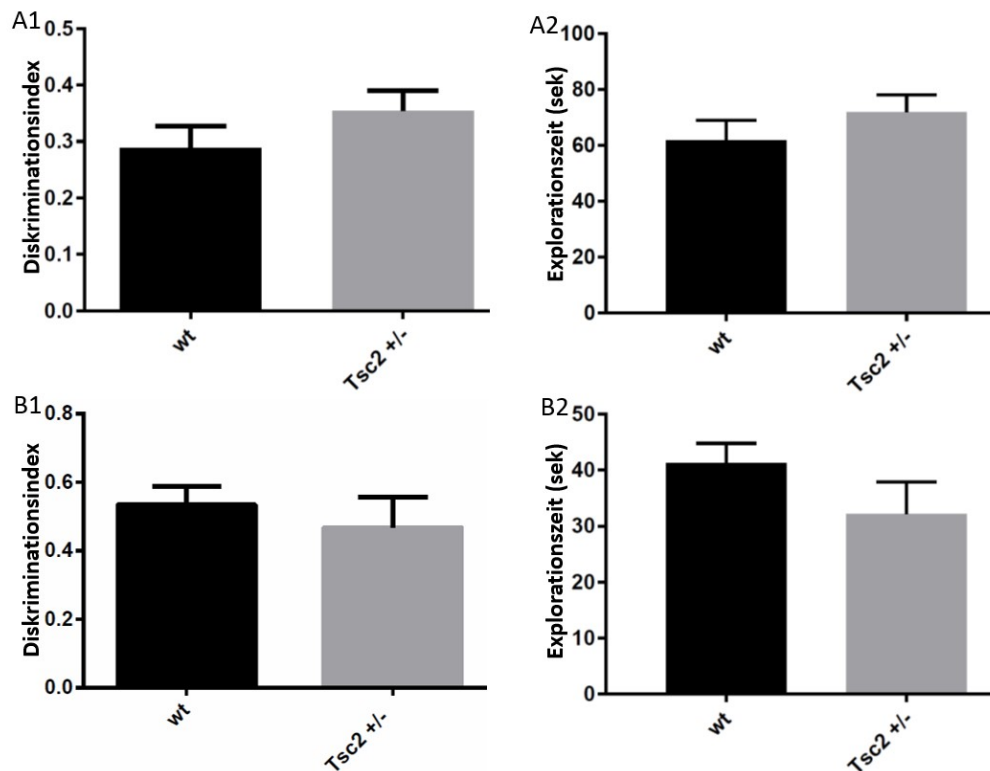


Abbildung 3.6: 24 Hours Novel Object Recognition Task (24 h NORT) zur Analyse kognitiver Fähigkeiten.

A), B) Nach 24 Stunden erinnern sich 3 m (A1) und 8 m (B1) alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse und die gleichaltrigen Kontrolltiere an das bereits bekannte Objekt und interessieren sich in einer 300-sekündigen Testphase mehr für das Unbekannte. Sowohl 3 m (A2), als auch 8 m (B2) alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere zeigen im Vergleich zu den jeweils gleichaltrigen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede nach Auswertung der Explorationszeiten. (A: 3 m wt: n = 23; 3 m $Tsc2^{+/-}$: n = 20; A1: 3 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,2237; A2: 3 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,2110; B: 8 m wt: n = 12; 8 m $Tsc2^{+/-}$: n = 12; B1: 8 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,7553; B2: 8 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0701; Mann-Whitney-U-Test)

3.1.3.4 *Seven Days Novel Object Recognition Task (7 d NORT)*

Der 7 d NORT (vergleiche 2.2.1.3.4) beurteilt die Gedächtniskonsolidierung, eine Gehirnfunktion, die vor allem auf Projektionen zwischen dem HC, dem entorhinalen und dem präfrontalen Cortex beruht. Die Versuchsdurchführung gleicht dem 24 h NORT (vergleiche 3.1.3.3), jedoch erfolgte nach der zweitägigen Lernphase mit zwei identischen Objekten eine siebentägige, versuchsfreie Zeit, bevor an Tag neun ein schon bekanntes und ein noch unbekanntes Objekt den Testmäusen gezeigt wurde. In diesem Verhaltensversuch wurden deutliche Unterschiede zwischen drei und acht Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Mäusen gefunden (Abb. 3.7). Drei Monate alte *Tsc2^{+/-}*-Tiere und die gleichaltrige Kontrollgruppe erinnerten sich an ein Objekt, das sie eine Woche zuvor über zwei Tage gezeigt bekamen und verbrachten in der Testphase an Tag neun mehr Zeit mit dem unbekanntem Objekt. Für beide Gruppen definierte der altersabhängige DI einen Wert 0,3 (Abb. 3.7 A). Die Auswertung der Explorationszeit zeigte, dass sowohl die drei Monate alte *Tsc2^{+/-}*-Mäuse, als auch die gleichaltrigen Kontrolltiere in Summe 70 von 300 sek mit beiden Objekten verbrachten (Abb. 3.7 A2). Im Gegensatz zu den drei Monate alten Versuchstieren, erinnerten sich die acht Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Gruppe nicht an das Objekt, welches sie eine Woche zuvor über zwei Tage zu Gesicht bekamen. Sie interessierten sich in der Testphase an Tag neun sowohl für das bereits bekannte als auch für das unbekanntes Objekt und verzeichnen einen DI von 0. Damit haben sie einen signifikant geringeren DI als die acht Monate alten Wildtypen, die einen altersabhängigen DI von 0,6 zeigten (Abb. 3.7 B1). Die Explorationszeit der älteren Mäuse verdeutlichte, dass diese Gruppe (*Tsc2^{+/-}*- und Kontrollgruppe) sich in Summe weniger für beide Objekte interessierte als die drei Monate alten Versuchstiere, obgleich die acht Monate alte *Tsc2^{+/-}*-Gruppe 15 sek mehr mit den Objekten verbrachte als die gleichaltrige Kontrollgruppe (Abb. 3.7 B2, Unterschied statistisch nicht signifikant). Versuchstiere, die eine Explorationszeit von unter 15 sek zeigten, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen (Bilsland et al., 2008; Ennaceur and Delacour, 1988; Langston and Wood, 2010).

Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit von J. Krummeich eine episodische Gedächtnisbatterie mit heterozygoten *Tsc2*-Mäusen durchgeführt. Das episodische Gedächtnis ist ebenfalls eine Gehirnfunktion, die von der hippocampalen-cortikalen Projektion abhängig ist. Entsprechend der Resultate aus dem 7 d NORT, konnten die Ergebnisse der episodischen Gedächtnisbatterie untermauern, dass sich ab dem achten Lebensmonat einer *Tsc2^{+/-}*-Maus auch im episodischen Gedächtnis Defizite entwickelt haben.

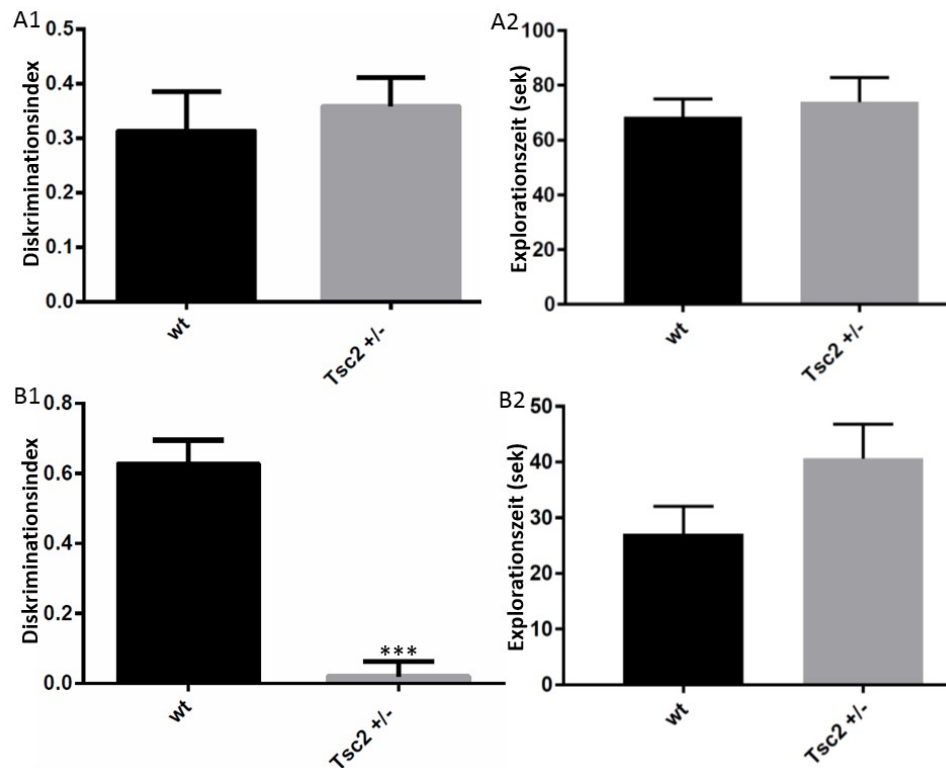


Abbildung 3.7: Seven Days Novel Object Recognition Task (7 d NORT) zur Analyse der Gedächtniskonsolidierung.

- A) Nach sieben Tagen erinnern sich 3 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse und die gleichaltrigen Kontrolltiere an das bekannte Objekt und interessieren sich in einer 300-sekündigen Testphase mehr für das Unbekannte (A1). 3 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere und deren Kontrollgruppen verbringen in Summe die gleiche Zeit mit Objekten (A2). (3 m wt: n = 8, 3 m $Tsc2^{+/-}$: n = 9; A1: 3 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,6806; A2: 3 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,7375; Mann-Whitney-U-Test)
- B) Nach sieben Tagen erinnern sich 8 m alte wildtypische Kontrolltiere an das bekannte Objekt und interessieren sich in einer 300-sekündigen Testphase mehr für das unbekanntes Objekt (B1). 8 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse erkennen das bereits bekannte Objekt nach sieben Tagen nicht mehr und interessieren sich sowohl für das bekannte als auch für das unbekanntes Objekt in gleichem Umfang (B1). 8 m alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere verbringen tendenziell mehr Zeit mit den Objekten als die Kontrollgruppe, obgleich das Ergebnis statistisch nicht signifikant ist (B2). (8 m wt: n = 10, 8 m $Tsc2^{+/-}$: n = 12; B1: 8 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,0001; B2: 8 m wt/ $Tsc2^{+/-}$: p = 0,1741; Mann-Whitney-U-Test)

3.2 Verhaltensexperimente mit $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

Unter Punkt 3.1 wurde die soziale Interaktion (vergleiche 3.1.1), das Angstverhalten (vergleiche 3.1.2) und die kognitive Leistung (vergleiche 3.1.3.1) von zwei und vier Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen und von deren gleichaltrigen Kontrollgruppen beschrieben. Die Resultate zeigten, dass zwei Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse noch keine Defizite im sozialen Verhalten aufwiesen. Vier Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse verbringen hingegen signifikant weniger Zeit mit einem unbekanntem Interaktionspartner und präsentieren zudem ein defizitäres Nestbauverhalten. Die Analyse des Angstverhaltens beschrieb zudem, dass vier Monate alte Wildtypen ein geringeres Angstverhalten im Vergleich zu den gleichaltrigen $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen zeigten. Die Testung der kognitiven Leistung verzeichnete jedoch in dem YM keine Unterschiede zwischen den Genotypen der zwei und vier Monate alten Gruppen.

Basierend auf diesen Verhaltensexperimenten und auf der Annahme, dass mTOR eine Schlüsselfunktion bei der Verarbeitung von CSS zukommt (vergleiche 1.5), wurden die vier Monate alten heterozygoten $Tsc2$ -Mäuse und deren Kontrollgruppe CSS (vergleiche 2.2.1.6) ausgesetzt. Im Anschluss wurde erneut die soziale Interaktion, das Angstverhalten und die kognitive Leistung studiert. Zudem folgten weitere Versuche, die die sensorische Funktion und eine mögliche Depressivität der Mäuse beschrieben.

3.2.1 Sozialverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

3.2.1.1 *Social Interaction (SI)*

Die Auswertung der SI nach CSS zeigte, dass sowohl die gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse als auch die gestressten wildtypischen Kontrollen weniger Zeit mit dem Interaktionspartner verbrachten als die jeweiligen ungestressten Vergleichsgruppen. Während die ungestressten Wildtypen mit einer für sie unbekanntem Maus einen SI-Index von 100 zeigten, war der SI-Index der gestressten Wildtypen um 40 Indexpunkte signifikant verringert. Die ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse zeigten mit einer für sie unbekanntem Maus einen SI-Index von 70, der SI-Index der gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse war im Vergleich um 20 Indexpunkte signifikant verringert (Abb. 3.8 A). Wie unter Punkt 3.1.1.1 bereits beschrieben, zeigten ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere im Vergleich zu den ungestressten Wildtypen ebenfalls ein defizitäres Sozialverhalten. Der SI-Index der ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse war im Vergleich zu den ungestressten Wildtypen um 25 SI-Indexpunkte signifikant vermindert.

Mit Hilfe einer weiteren graphischen Darstellung konnten Mäuse herausgestellt werden, die eine mentale Resilienz aufzeigten. Als Resilient werden gestresste Wildtypen definiert, für die im Vergleich zu dem SI-Index-Mittelwert von den ungestressten Wildtypen ein größerer SI-Index verzeichnet wird. Als Resilient werden ebenso gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse angesehen, für die im Vergleich zu dem SI-Index-Mittelwert von den ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tieren ein größerer SI-Index gezeigt wird (Abb. 3.8 B).

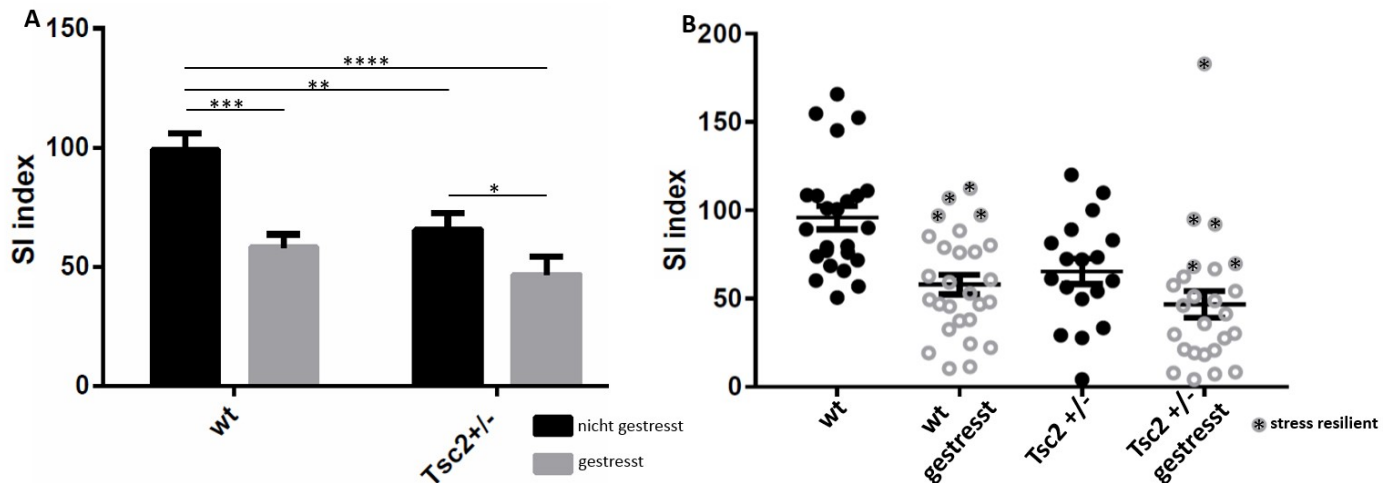


Abbildung 3.8: Social Interaction (SI) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 2,5-minütigen Testperiode.

- A) Sowohl 4 m alte gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse als auch 4 m alte gestresste wildtypische Kontrollen verbringen weniger Zeit mit dem Interaktionspartner als die jeweiligen ungestressten Vergleichsgruppen. Ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere verbringen im Vergleich zu der ungestressten Kontrollgruppe signifikant weniger Zeit mit einem unbekanntem Interaktionspartner. (nicht gestresst wt: n = 19, nicht gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 18, gestresst wt: n = 27, gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 25; wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,0001, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0064, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = < 0,0001, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,3762, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0786, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0216; Mann-Whitney-U-Test)
- B) 15 % der gestressten Wildtypen und 20 % der gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere zeigen eine mentale Resilienz. Als Resilient werden gestresste Wildtypen definiert, für die im Vergleich zu dem SI-Index-Mittelwert von den ungestressten Wildtypen ein größerer SI-Index verzeichnet wird, und gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse für die im Vergleich zu dem SI-Index-Mittelwert von den ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere ein größerer SI-Index gezeigt wird.

3.2.1.2 Nest Building (NB)

Wie unter Punkt 3.1.1.1 schon dargestellt werden konnte, zeigten vier Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Tiere im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen signifikante Unterschiede in der Nestbauqualität. Weiterhin nutzten ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere im Vergleich zu gestressten und ungestressten Wildtypen signifikant weniger Nestbaumaterial (1,7 von 2,5 g), und wurden mit einer signifikant geringeren Rangnummer (2,5 von fünf) bewertet. Nach CCS der $Tsc2^{+/-}$ -Tiere gleichete sich das Nestbauverhalten wieder dem der Wildtypen (gestresste und ungestresste) an (Abb. 3.9 A1, A2). Die gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere wurden mit einer Rangnummer von vier bewertet und nutzten 2,2 g Nestbaumaterial.

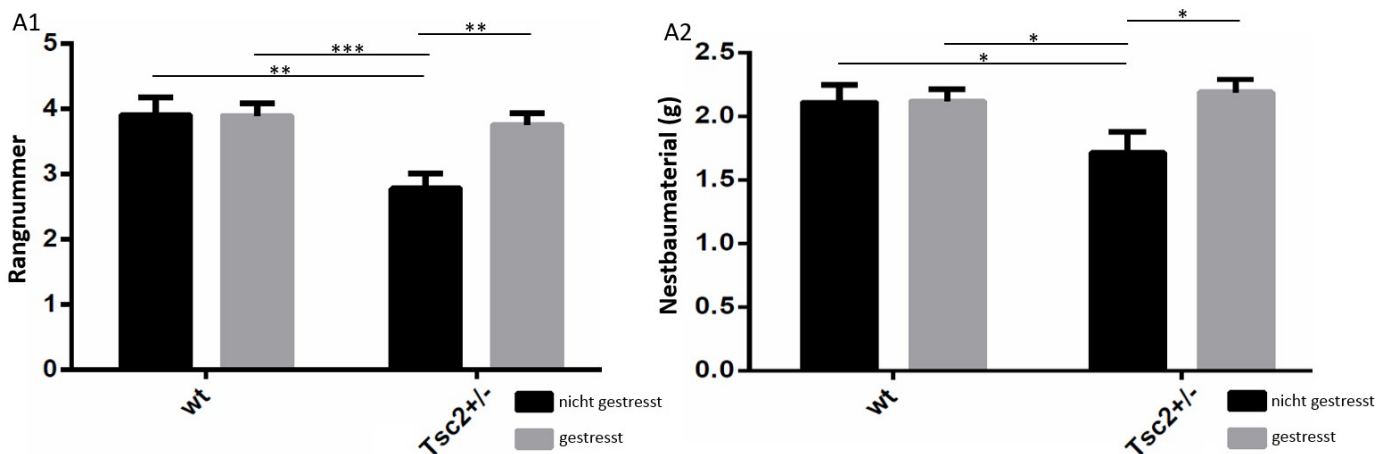


Abbildung 3.9: Nestbauverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS).

A) 4 m alte ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere sind im Vergleich zu gestressten und ungestressten wt mit einer signifikant geringeren Rangnummer bewertet (A1) und nutzen signifikant weniger Nestbaumaterial (B2). Das Nestbauverhalten von gleichaltrigen gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen gleicht dem Nestbauverhalten der gestressten und ungestressten wt (A1, A2). (nicht gestresst wt: n = 19, nicht gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 19, gestresst wt: n = 27, gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 25; B1: wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,2460, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0003, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0654, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0005, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,5015, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0025; B2: wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,0847, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0057, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,5820, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,01860, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,2934, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0311; Mann-Whitney-U-Test).

3.2.2 Angstverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

3.2.2.1 *Elevated Plus Maze* (EPM)

Die Analyse des Angstverhaltens nach CSS untermauert die unter Punkt 3.1.2.1 beschriebenen Ergebnisse des EPM-Tests. Vier Monate alte nicht gestresste Wildtypen zeigten im Gegensatz zu gleichaltrigen nicht gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen ein geringeres Angstverhalten. Während ungestresste Wildtypen 70 von 300 sek in den offenen Armen verweilten, hielten sich ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere nur 30 sek in den offenen Armen auf. Gestresste Wildtypen und $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse verbrachten im Vergleich zu den gestressten Wildtypen signifikant weniger Zeit in den offenen Armen (Abb. 3.10).

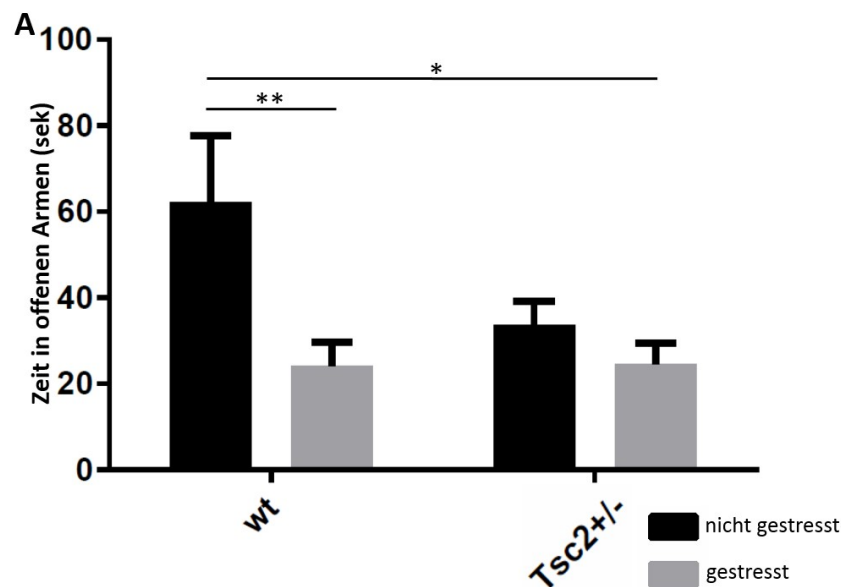


Abbildung 3.10: Angstverhalten im *Elevated Plus Maze* (EPM) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 300-sekündigen Testperiode.

A) 4 m alte nicht gestresste wt zeigen im Gegensatz zu nicht gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen ein geringeres Angstverhalten. Gestresste wt und gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse verbrachten im Vergleich zu den ungestressten wt signifikant weniger Zeit in den offenen Armen. (nicht gestresst wt: n = 19, nicht gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 19, gestresst wt: n = 27, gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 25; p = 0,0055; wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,5585, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0120, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0745, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,6325, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,1094; Mann-Whitney-U-Test)

3.2.3 Kognitive Leistung nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

3.2.3.1 *Spontaneous Alternation in Y maze (YM)*

Weiterhin sollte die Entwicklung einer möglichen kognitiven Beeinträchtigung von heterozygoten *Tsc2*-Mäusen nach CSS analysiert werden. Für dieses Versuchsvorhaben wurde das Hippocampus-basierende YM (vergleiche 2.2.1.3.1) mit vier Monate alten gestressten und ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und Kontrollgruppen durchgeführt. Wie bereits unter Punkt 3.1.3.1 beschrieben werden konnte, präsentierten vier Monate alte nicht gestresste *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und deren ungestresste Kontrollen in einer zehnminütigen Testperiode spontane Richtungswechsel von 60 %. Nach CSS zeigten *Tsc2*^{+/-}-Tiere signifikant mehr spontane Richtungswechsel im Vergleich zu den ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (Abb. 3.11). Zusammenfassend konnte mit diesem Hippocampus-basierenden Verhaltensversuch gezeigt werden, dass sich kognitive Veränderungen nach CSS nur bei *Tsc2*^{+/-}-Mäusen entwickeln.

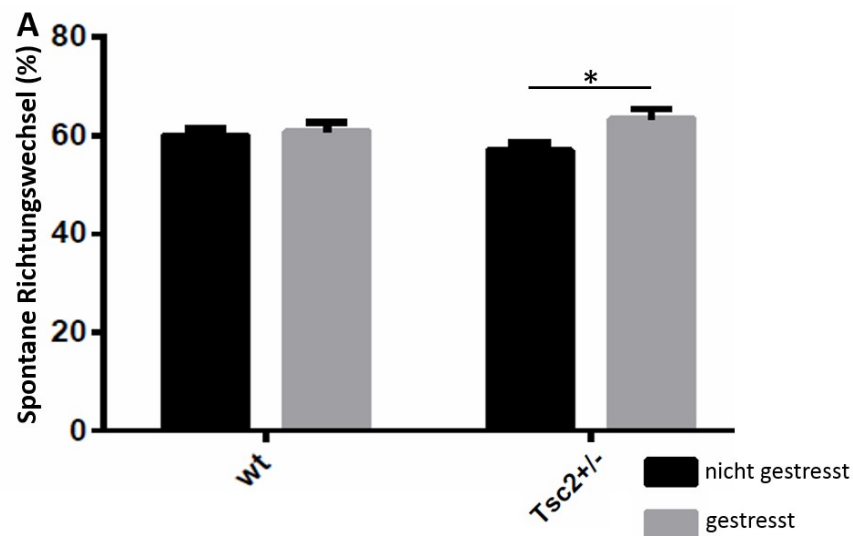


Abbildung 3.11: Spontaneous Alternation in Y maze (YM) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer zehnminütigen Testphase.

A) 4 m alte ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere zeigen im Vergleich zu der ungestressten Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede nach der prozentualen Auswertung der spontanen Richtungswechsel. 4 m alte gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse präsentieren signifikant mehr spontane Richtungswechsel als die ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere. (nicht gestresst wt: n = 19, nicht gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 19, gestresst wt: n = 27, gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 25; wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,9348, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,3994, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,4194, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,2384, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,4873, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0494; Mann-Whitney-U-Test)

3.2.4 Sensorische Funktion nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

3.2.4.1 Prepulse Inhibition (PPI)

Die PPI wurde in der vorliegenden Doktorarbeit genutzt, um die sensorische Funktion beziehungsweise die Schreckreaktion einer Versuchsmaus zu untersuchen. Dabei beschreibt die PPI die prozentuale Abnahme einer Schreckreaktion auf einen Schreckreiz, dem ein abgeschwächter Reiz vorausgeht. Der abgeschwächte Reiz wurde 100 ms vor dem eigentlichen Schreckreiz mit einer Intensität von 70, 75 und 80 dB den Versuchsmäusen präsentiert. Um den Schreckreflex aufzuzeichnen, wurde die zu testende Maus für 30 min in eine schalldichte Kammer gesetzt, in der über Bodensensoren die Bewegung aufgezeichnet wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass alle Versuchstiere für 70 dB, 75 dB und 80 dB eine PPI zwischen 30 bis 40 % zeigten (Abb. 3.12). Der Vergleich von drei bis vier Monate alten ungestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tieren mit gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tieren und der Vergleich von drei bis vier Monate alten ungestressten Wildtypen mit gestressten Wildtypen wies keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 70 dB, bei 75 dB und bei 80 dB auf. Drei bis vier Monate alte ungestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere zeigten verglichen mit der ungestressten, gleichaltrigen Kontrollgruppe ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 70 dB, bei 75 dB und bei 80 dB. Die Gegenüberstellung von drei bis vier Monate alten, gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen mit den gestressten Kontrolltieren präsentierte auch keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 75 dB und bei 80 dB. Der Vergleich von drei bis vier Monate alten chronisch gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen mit den gestressten Kontrolltieren zeigte einen signifikanten Unterschied der PPI bei 75 dB. Gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere hatten eine PPI von 30 %. Gestresste Wildtypen präsentierten hingegen eine PPI von 40 % und zeigten somit eine signifikant höhere PPI im Vergleich zu den gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tieren (Abb. 3.12). Das bedeutet, dass die chronisch gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tiere eine signifikant höhere Schreckreaktion bei 70 dB aufzeigten als die chronisch gestressten Wildtypen.

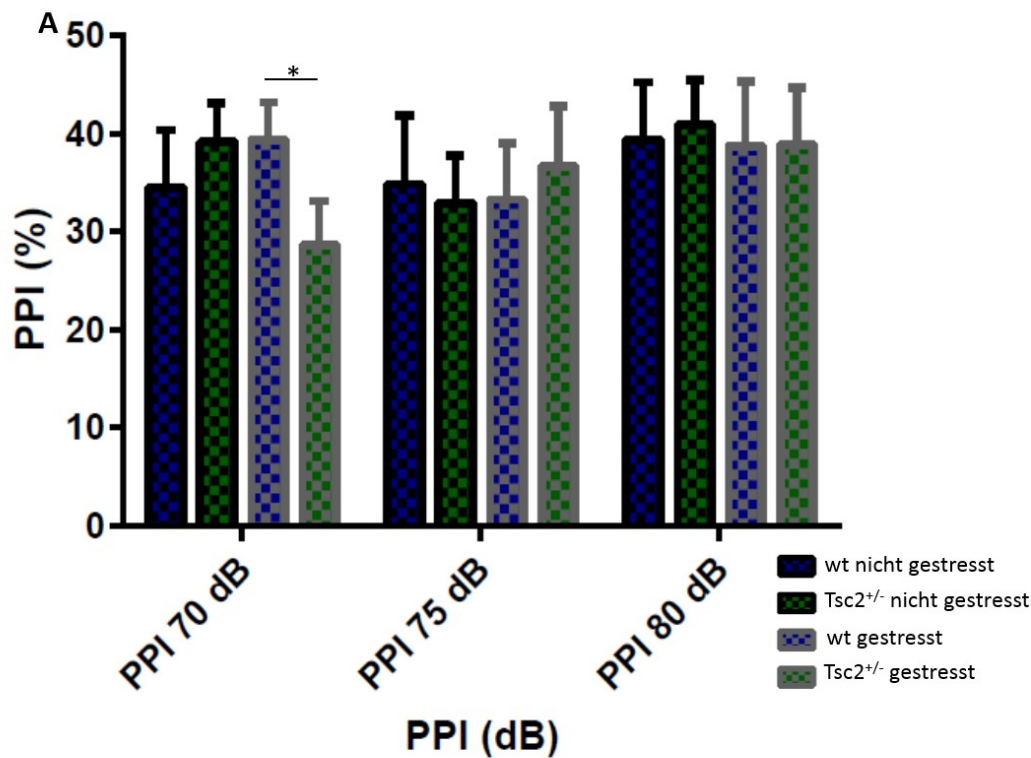


Abbildung 3.12: Prepulse Inhibition (PPI) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 30-minütigen Testperiode.

A) Alle Versuchstiere zeigen für 70 dB, 75 dB und 80 dB eine PPI zwischen 30 bis 40 %. Der Vergleich von 3-4 m alten ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren mit gestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren und der Vergleich von 3-4 m alten ungestressten wt mit gestressten wt weist keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 70 dB, bei 75 dB und bei 80 dB auf. Die Gegenüberstellung von 3-4 m alten ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren mit der ungestressten, gleichaltrigen Kontrollgruppe präsentiert ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 70 dB, bei 75 dB und bei 80 dB. Zwischen 3-4 m alten gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und gestressten Kontrolltieren werden keine signifikanten Unterschiede der PPI bei 75 dB und bei 80 dB gezeigt. Der Vergleich von 3-4 m alten gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen mit den gestressten Kontrolltieren zeigt einen signifikanten Unterschied der PPI bei 75 dB. (nicht gestresst wt: n = 13, nicht gestresst *Tsc2*^{+/-}: n = 13, gestresst wt: n = 10, gestresst *Tsc2*^{+/-}: n = 13; PPI 70 dB: wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,4776, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,5743, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,2945, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,5743, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,0457, *Tsc2*^{+/-} nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,1014; PPI 75 dB: wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,8874, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,9362, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,9362, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,7689, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,582, *Tsc2*^{+/-} nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,7623; PPI 80 dB: wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,7987, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,7689, wt nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,8938, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} nicht gestresst: p = 0,8938, wt gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,8517, *Tsc2*^{+/-} nicht gestresst/*Tsc2*^{+/-} gestresst: p = 0,8403; Mann-Whitney-U-Test)

3.2.5 Tail Suspension (TS) nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

Der TS-Test gibt Aufschluss über einen möglichen depressiven Zustand der Versuchsmäus. Dabei wird die Eigenschaft genutzt, dass Mäuse versuchen einem unangenehmen Stressreiz zu entkommen. Wehrt sich das Versuchstier nicht gegen eine unangenehme Situation, deutet dies auf eine Selbstaufgabe und einen möglichen depressiven Zustand hin. Für diese Analyse wurden die vier Monate alten Testmäuse am Schwanz fixiert und die Selbstaufgabe beziehungsweise die immobile Phase wurde während einer sechsminütigen Testperiode gemessen (vergleiche 2.2.1.4). Die Auswertung der Analyse zeigte zwischen ungestressten und gestressten Wildtypen und zwischen ungestressten und gestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren keine signifikanten Unterschiede. Jedoch waren sowohl ungestresste, als auch gestresste *Tsc2*^{+/-}-Tiere 25 sek länger immobil als die gestressten Wildtypen und präsentierten somit eine signifikant längere bewegungslose Phase (Abb. 3.13).

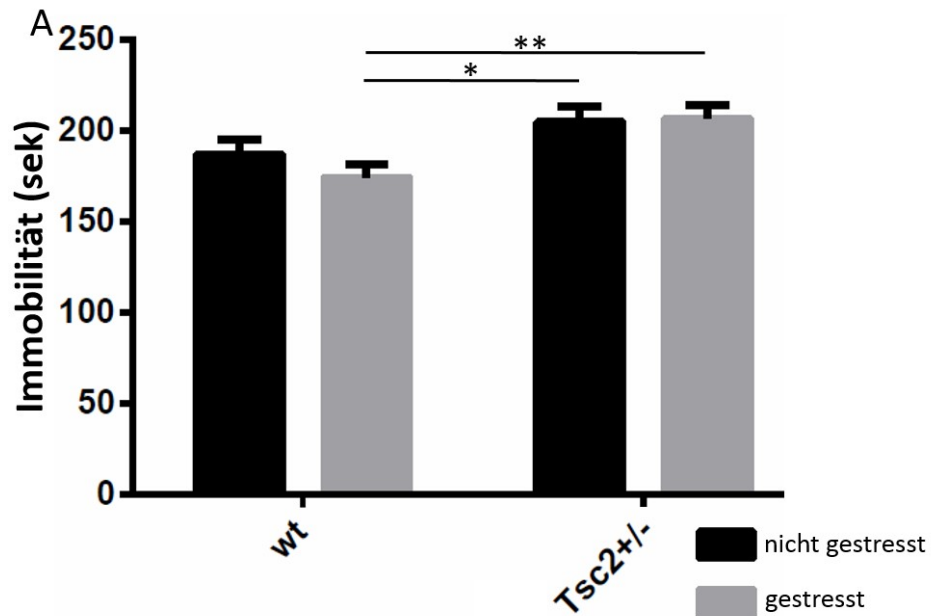


Abbildung 3.13: Tail Suspension (TS) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 360-sekündigen Testphase.

A) Der Vergleich zwischen 4 m alten ungestressten und gestressten wt und zwischen 4 m alten ungestressten und gestressten $Tsc2^{+/-}$ -Tieren zeigt keine signifikanten Unterschiede. Jedoch sind sowohl ungestressten als auch gestresste $Tsc2^{+/-}$ -Tiere signifikant länger immobil als die gestressten wt. (nicht gestresst wt: n = 19, nicht gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 19, gestresst wt: n = 27, gestresst $Tsc2^{+/-}$: n = 25; wt nicht gestresst/wt gestresst: p = 0,3841, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,2047, wt nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0686, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst: p = 0,0234, wt gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,0027, $Tsc2^{+/-}$ nicht gestresst/ $Tsc2^{+/-}$ gestresst: p = 0,6850; Mann-Whitney-U-Test)

3.3 Proteinnetzwerkanalysen von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen

Um die Ergebnisse der Verhaltensversuche auf molekularer Ebene zu erläutern, wurden Netzwerkanalysen von Proteinen durchgeführt, welche mit der mTOR-Signalkaskade assoziiert sind. Die Proteinquantifizierung wurde in den Gehirnregionen Cortex, PFC und HC von zwei, vier und acht Monate alten Versuchsmäusen über eine SDS-PAGE (vergleiche 2.2.3.2) mit darauffolgendem Western Blot (vergleiche 2.2.3.3) vollzogen. Zunächst wurde das *Tsc2*-Protein analysiert. Die Western-Blot-Analyse des Cortex zeigte eine signifikante Abnahme der *Tsc2*-Proteinkonzentration in zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu der zwei Monate alten Kontrollgruppe (Abb. 3.14 A1). Sowohl zwischen vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrige Kontrollgruppe, als auch zwischen acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrige Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede des *Tsc2*-Proteinlevels verzeichnet. Die Auswertung der Western Blots des PFC zeigte für alle drei Altersgruppen im Vergleich zwischen den heterozygoten *Tsc2*-Mäusen zu den jeweiligen wildtypischen Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede im *Tsc2*-Proteinlevel (Abb. 3.14 A2). Die hippocampale Proteinanalyse beschrieb sowohl für zwei Monate alte, als auch für vier Monate alte Versuchstiere keine Veränderungen des *Tsc2*-Proteingehalts zwischen gleichaltrigen Genotypen. Auffällig war jedoch der HC von acht Monate alten Mäusen. Hier zeigte die Western Blot-Analyse eine signifikante Abnahme der *Tsc2*-Proteinkonzentration in acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen (Abb. 3.14 A3).

Wie bereits unter Punkt 1.2 detailliert beschrieben, spielen AMPA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei Lernprozessen und der Gedächtnisbildung. Dabei ist die Calcium-permeable Untereinheit GluA1 absolut notwendig für Initiation der LTP. Die Translation von GluA1 wird wiederum über die mTOR-Signalkaskade reguliert. Die Calcium-undurchlässige Untereinheit GluA2 übernimmt die Kontrolle während der LTD. Weiterhin ist das Protein PSD95 ein wichtiger postsynaptischer Regulator, der über Nanodomänen die AMPA-Rezeptoren mit dem Zytoskelett verbindet. In der vorliegenden Arbeit wurden Western Blot-Analysen der Proteine GluA1, GluA2 und PSD95 durchgeführt. Die Resultate des Cortex zeigten keine Unterschiede der GluA1- und der GluA2-Proteinkonzentration zwischen zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrigen Kontrollgruppen (Abb. 3.15 A1 und B1). Im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren zeigte sich im Cortex von zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren ebenfalls keine Veränderung in der Verhältnisanalyse von der

Untereinheit GluA1 zu der Untereinheit GluA2. (Abb. 3.15 C1). Sowohl das GluA1- als auch das GluA2-Proteinlevel ist im Cortex von vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen signifikant erhöht (Abb. 3.15 A1, B1). Die Verhältnisanalyse von GluA1 zu GluA2 beschrieb jedoch eine deutliche Verschiebung und zeigte somit, dass die GluA1-Untereinheiten im Verhältnis zu den GluA2-Untereinheiten im Cortex der vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse stärker vertreten sind (Abb. 3.15 A1, B1). Der Vergleich zwischen acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und gleichaltrigen Wildtypen zeigte sowohl für GluA1 als auch für GluA2 keine Unterschiede im Proteinlevel (Abb. 3.15 A1, B1). Ebenso wurde für diese Altersgruppe keine Verschiebung im GluA1/GluA2-Verhältnis verzeichnet (Abb. 3.15 C1). Die Auswertung der Immunoblots des PFC zeigte für acht Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme sowohl von GluA1 als auch von GluA2. Weiterhin verzeichnete die Proteinanalyse für zwei und vier Monate alte heterozygote *Tsc2*-Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen wildtypischen Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in dem GluA1-, als auch in dem GluA2-Proteinlevel (Abb. 3.15 A2, B2). Im Gegensatz zu diesen Resultaten wurde für die Verhältnisanalyse von zwei und vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen eine deutliche Verschiebung von GluA2 zu GluA1 im PFC verzeichnet (Abb. 3.15 C2). Acht Monate alte Versuchstiere zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede im GluA1/GluA2-Verhältnis im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen (Abb. 3.15 C2). Die hippocampale Western Blot-Analyse beschrieb sowohl für zwei Monate alte, als auch für vier und ebenso für acht Monate alte Versuchstiere keine Veränderungen im GluA1-Proteingehalt im Vergleich zwischen den gleichaltrigen Genotypen (Abb. 3.15 A3). Die Analyse des GluA2-Proteinlevels im HC präsentierte kontroverse Ergebnisse. Zwei Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigten im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede. Vier Monate alte Hippocampi von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigten im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine signifikante Erhöhung der GluA2-Proteinkonzentration. Hippocampi von acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren verzeichneten hingegen eine signifikante Abnahme (Abb. 3.15 B3). Die hippocampale GluA1/GluA2-Verhältnisanalyse zeigte in zwei und acht Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.15 C3). Die vier Monate alten Tiere präsentierten hingegen signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und somit eine deutliche Verschiebung von GluA2 zu GluA1 in dem HC der *Tsc2*^{+/-}-Tiere (Abb.3.15 C3).

Die Analyse des PSD95-Proteins im Cortex verzeichnete sowohl zwischen zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrige Kontrollgruppe als auch zwischen vier Monate alten

Tsc2^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrige Kontrollgruppe keine Unterschiede im Proteinlevel (Abb. 3.16 A1). Auffällig war jedoch die PSD95-Proteinanalyse von acht Monate alten Mäusen. Hier wurde eine signifikante Abnahme der PSD95-Proteinkonzentration im Cortex von *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen aufgewiesen (Abb. 3.16 A1). Die Western Blot-Analyse von PSD95 in dem PFC zeigte sowohl zwischen zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere und der gleichaltrigen Kontrollgruppe, als auch zwischen vier Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen und der gleichaltrigen Kontrolle keine Unterschiede (Abb. 3.16 A2). Der Vergleich zwischen den Genotypen der acht Monate alten Mäuse verzeichnete hingegen eine Zunahme der PSD95-Konzentration in dem PFC von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen. Die Auswertung der Western Blots des HC zeigte für alle drei Altersgruppen im Vergleich der heterozygoten *Tsc2*-Mäuse zu den jeweiligen wildtypischen Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede im PSD95-Proteinlevel (Abb. 3.16 A3). Erwähnenswert ist jedoch, dass die vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse mit einem p-Wert von 0,0573 eine deutliche Abnahme des PSD95-Proteins im Vergleich zu deren Kontrolltieren aufwiesen.

S6 ist ein weiteres mTOR assoziiertes Protein. Die Phosphorylierung von S6 (pS6) spielt eine Schlüsselfunktion bei der mTOR-gesteuerten Regulation der mRNA-Translation beziehungsweise der Proteinsynthese (Ma and Blenis, 2009). Im Folgenden werden die Western Blot-Analysen von S6 beziehungsweise pS6 vorgestellt. Die Auswertung zeigte, dass das S6-Proteinlevel im Cortex sowohl von zwei als auch von acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren dem der jeweiligen Kontrollgruppen entsprach. Der Cortex von vier Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen zeigte hingegen eine signifikante Reduktion der S6-Proteinkonzentration im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen (Abb. 3.17 A1). Die Proteinanalyse des PFC beschrieb sowohl für zwei Monate alte, als auch für vier Monate alte Versuchstiere keine Veränderungen in dem S6-Proteingehalt zwischen gleichaltrigen Genotypen. Auffällig war jedoch der PFC von den acht Monate alten Mäusen. Hier zeigte die Western Blot-Analyse eine signifikante Zunahme der S6-Proteinkonzentration in dem PFC der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen (Abb. 3.17 A2). Die hippocampale Western Blot-Auswertung zeigte sowohl für zwei, als auch für vier und acht Monate alte heterozygote *Tsc2*-Tiere keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollen. Der HC von vier Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen zeigte hingegen eine signifikante Abnahme der S6-Proteinkonzentration im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen (Abb. 3.17 A3). Weiterhin wurde das pS6-Proteinlevel untersucht. Zwischen den Genotypen der zwei und vier Monate alten Gruppen wurde in der Cortex-

Region kein Unterschied des pS6-Proteingehalts verzeichnet. Der Cortex von acht Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen wies jedoch eine signifikante Reduktion von phosphoryliertem S6 im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Abb. 3.17 B1). Die pS6-Proteinanalyse des PFC beschrieb sowohl für zwei Monate alte als auch für vier Monate alte Versuchstiere keine Veränderungen zwischen gleichaltrigen Genotypen. Gegenätzlich zeigten acht Monate alte Mäuse eine signifikante Zunahme der pS6-Proteinkonzentration in dem PFC der *Tsc2*^{+/-}-Tiere im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen (Abb. 3.17 B2). Die Auswertung der Immunoblots des HC verzeichnete für die Genotypen von allen drei Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede im pS6-Proteinlevel (Abb. 3.17 B3). Im Folgenden wurde das Verhältnis von pS6 zu S6 untersucht. Die Verhältnisanalyse von pS6 zu S6 in der Cortex-Region von zwei und vier Monate alten Mäusen zeigte keine signifikanten Verschiebungen zwischen den jeweiligen Genotypen. Der Cortex von acht Monate alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen wies jedoch eine signifikante Verschiebung des Proteingehalts von pS6 zu S6 im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Abb. 3.17 C1). Der PCF von zwei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren zeigte im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen eine signifikante Verschiebung von S6 zu pS6. Zwischen den Genotypen der zwei und vier Monate alten Gruppen wurden Unterschiede im pS6/S6-Verhältnis aufgezeigt (Abb. 3.17 C2). Die Auswertung der Immunoblots des HC verzeichnete für die Genotypen von allen drei Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Verhältnis von pS6 zu S6 (Abb. 3.17 C3).

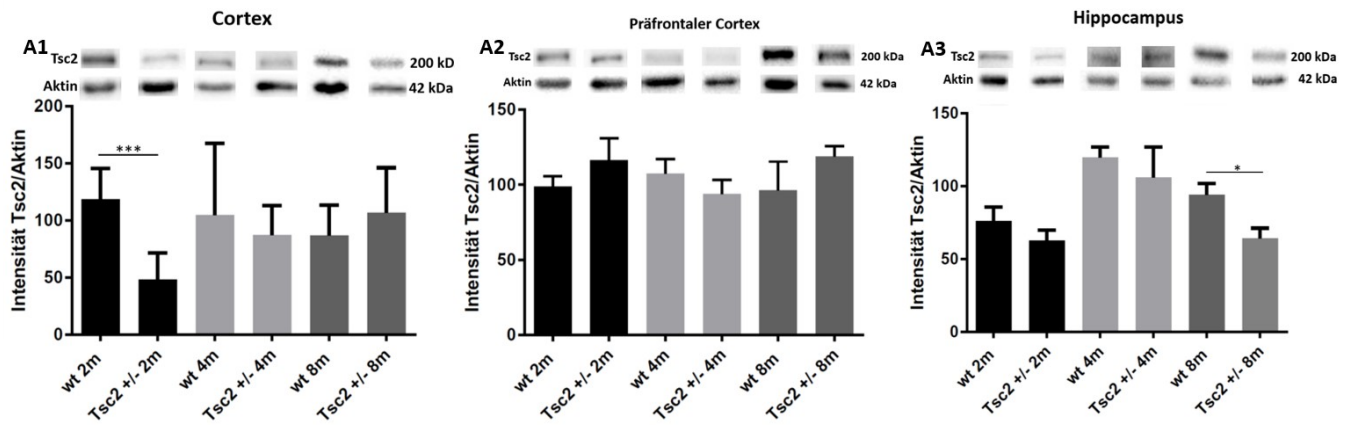


Abbildung 3.14: Tsc2-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.

A) Der Cortex (A1) von 2 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu gleichaltrigen wt eine signifikante Abnahme der Tsc2-Proteinkonzentration. Sowohl zwischen 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und der gleichaltrigen Kontrollgruppe, als auch zwischen 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren gleichaltrige Kontrollgruppe werden keine Unterschiede im Tsc2-Proteinlevel verzeichnet. Der PFC (A2) von 2 m, 4 m und von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verzeichnet im Vergleich zu den jeweiligen wildtypischen Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede im Tsc2-Proteinlevel. Die hippocampale Proteinanalyse beschreibt für 2 m und 4 m alte Versuchstiere keine Veränderungen des Tsc2-Proteingehalts im Vergleich der gleichaltrigen Genotypen. Der HC (A3) zeigt eine signifikante Abnahme der Tsc2-Proteinkonzentration in 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den gleichaltrigen wt. (A1: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 5, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0009, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,6233, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3414; A2: 2 m wt: n = 5, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 4, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3, 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3074, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3774, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3774; A3: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4m wt: n = 5, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3350, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5178, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0204; t-Test)

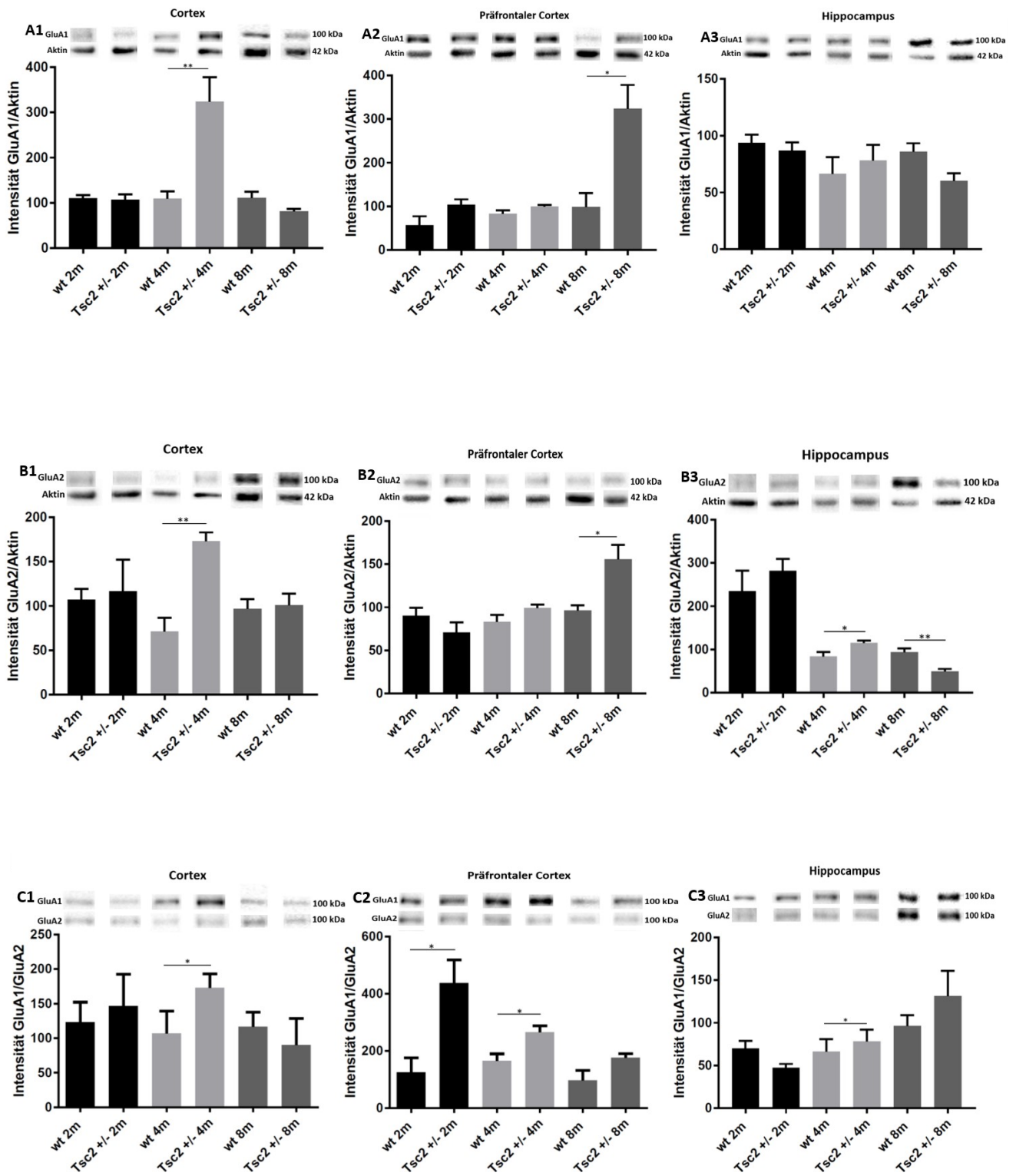


Abbildung 3.15: GluA1- und GluA2-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.

- A) Der Cortex (A1) von 2 m und 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu den gleichaltrigen wt keine Unterschiede im GluA1-Proteingehalt. Das GluA1-Proteinlevel ist im Cortex von 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Der PFC (A2) verzeichnet keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen der 2 m und 4 m alten Versuchstiere. Das GluA1-Proteinlevel ist im PFC von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Die hippocampale Western Blot-Analyse (A3) zeigt für 2 m, 4 m und 8 m alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen keine Veränderungen im GluA1-Proteingehalt. (A1: 2 m wt: n = 5, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,8015, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0089, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0649; A2: 2 m wt: n = 5, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 4, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0809, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1135, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0125; A3: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5286, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5764, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0341; t-Test)
- B) Der Cortex (B1) von 2 m und 8 m *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen keine Unterschiede im GluA2-Proteingehalt. Das GluA2-Proteinlevel ist im Cortex von 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Der PFC (B2) verzeichnet keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen der 2 m und 4 m alten Versuchstiere. Das GluA2-Proteinlevel ist im PFC von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu deren Kontrollgruppe signifikant erhöht. Der HC (B3) zeigt für 2 m alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere im Vergleich zu deren Kontrollen keine signifikanten Unterschiede. Hippocampi von 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigen im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der GluA2-Proteinkonzentration. Hippocampi von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren verzeichnen hingegen eine signifikante Abnahme. (B1: 2 m wt: n = 4, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 4 m wt: n = 5, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,8035, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0013, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,08249; B2: 2 m wt: n = 6, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 3, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2213, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1135, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0284; B3: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 5, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,4558, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0487, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0030; t-Test)
- C) Der Cortex (C1) von 2 m und 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu den gleichaltrigen wt keine Unterschiede im GluA1 zu GluA2-Verhältnis. Für die 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere wird hingegen eine signifikante Verschiebung von GluA2 zu GluA1 verzeichnet. Der PFC (C2) von 2 m und 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt eine signifikante Verschiebung von GluA2 zu GluA1. Der PFC (C2) von 8 m alten Versuchstieren weist hingegen keine signifikanten Unterschiede im GluA1/GluA2-Verhältnis zwischen den Genotypen auf. Der HC (C3) von 2 m und 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu den gleichaltrigen wt keine Unterschiede im GluA1 zu GluA2-Verhältnis. Für die 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere wird eine signifikante Verschiebung im GluA1/GluA2-Verhältnis verzeichnet. (C1: 2 m wt: n = 4, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,4176, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0133, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1735; C2: 2 m wt: n = 4, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 3, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0182, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0263, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1008; C3: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0700, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5764, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2739; t-Test)

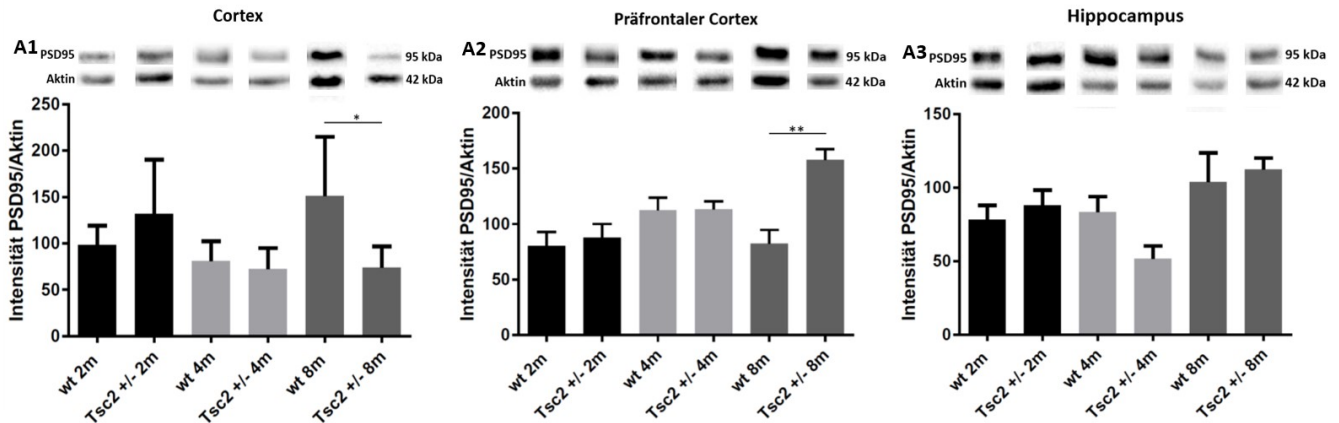


Abbildung 3.16: PSD95-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.

A) Die Analyse des PSD95-Proteins zeigt für den Cortex (A1) zwischen 2 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren Kontrollgruppe, als auch zwischen 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren Kontrollgruppe keine Unterschiede im Proteingehalt. Der Cortex (A1) von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren verzeichnet im Vergleich zu den gleichaltrigen wt eine signifikante Abnahme der PSD95-Proteinkonzentration. Der PFC (A2) zeigt sowohl zwischen 2 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren und deren Kontrollgruppe, als auch zwischen 4 m alten heterozygoten *Tsc2*-Mäuse und deren Kontrollen keine Unterschiede in dem Proteinlevel von PSD95. Der Vergleich zwischen den Genotypen der 8 m alten Mäuse verzeichnet eine Zunahme von PSD95 in dem PFC von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen. Der HC (A3) zeigt im Vergleich der jeweiligen Genotypen von 2 m, 4 m und 8 m alten Versuchsmäusen keine signifikanten Unterschiede im PSD95-Proteingehalt. (A1; 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1844, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,6412, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0317; A2: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 4, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 4, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,6900, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,9435, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0064; A3: 2 m wt: n = 7, 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5, 4 m wt: n = 5, 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4, 8 m wt: n = 6, 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5210, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0573, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,6930; t-Test)

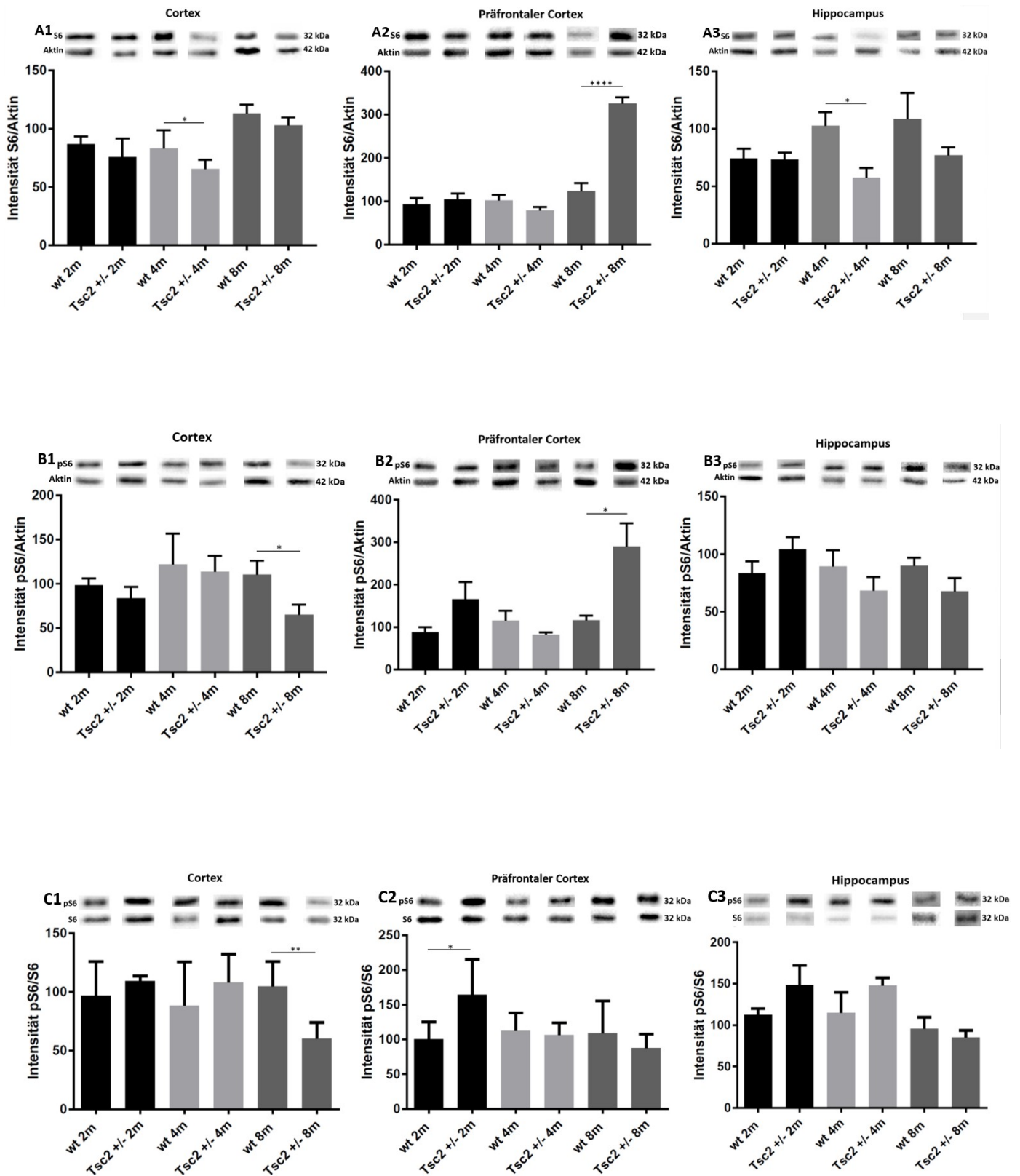


Abbildung 3.17: S6- und pS6-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.

- A) Das S6-Proteinlevel im Cortex (A1) entspricht sowohl in 2 m alten als auch in 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere dem der jeweiligen Kontrollgruppe. Der Cortex von 4 m alten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen zeigt eine signifikante Reduktion der S6-Proteinkonzentration im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen. Der PFC (A2) beschreibt für 2 m und für 4 m alte Versuchstiere keine Veränderungen in dem S6-Proteingehalt zwischen gleichaltrigen Genotypen. Der PFC von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt im Vergleich zu gleichaltrigen wt eine signifikante Zunahme der S6-Proteinkonzentration. Die hippocampale Western Blot-Auswertung (A3) beschreibt für 2 m und 8 m alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollen. Der HC von 4 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigt eine signifikante Abnahme im S6-Proteingehalt im Vergleich zu den wt. (A1: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 6; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,4841, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3834, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3278; A2: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 4; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 4; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5945, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1835, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = < 0,0001; A3: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 6; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,9430, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0211, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2555; t-Test)
- B) Der Cortex (B1) von 2 m und 4 m alten Mäusen zeigt zwischen den jeweiligen Genotypen keinen Unterschied im pS6-Proteingehalt. Der Cortex von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen weist im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Reduktion an phosphoryliertem S6 auf. Der PFC (B2) beschreibt für 2 m und für 4 m alte Versuchstiere keine Veränderungen zwischen den jeweiligen gleichaltrigen Genotypen. 8 m alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigen im Vergleich zu gleichaltrigen wt eine signifikante Zunahme der pS6-Proteinkonzentration. Der HC (B3) verzeichnet für die jeweiligen Genotypen von allen drei Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede im pS6-Proteinlevel. (B1: 2 m wt: n = 6; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 6; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3160, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,8529, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0417; B2: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 4; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 3; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0613, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2132, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0351; B3: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 6; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2020, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3125, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1209; t-Test)
- C) Die Verhältnisanalyse von pS6 zu S6 in der Cortex-Region (C1) von 2 m und 4 m alten Mäusen zeigt keine signifikanten Verschiebungen zwischen den jeweiligen Genotypen. Der Cortex von 8 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen weist im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Verschiebung des Proteingehalts von pS6 zu S6 auf. Der PCF (C2) von 2 m alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigt im Vergleich zu gleichaltrigen wt eine signifikante Verschiebung von S6 zu pS6. Zwischen den jeweiligen Genotypen der 2 m und 4 m alten Gruppen werden keine Unterschiede im pS6/S6-Verhältnis verzeichnet. Der HC (C3) von 2 m, 4 m und 8 m zeigt im Vergleich der jeweiligen Genotypen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Verhältnis von pS6 zu S6. (C1: 2 m wt: n = 6; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 7; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 6; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,4241, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,3939, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0030; C2: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 4; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 3; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 3; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,0154, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,6982, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5044; C3: 2 m wt: n = 7; 2 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 4 m wt: n = 5; 4 m *Tsc2*^{+/-}: n = 4; 8 m wt: n = 6; 8 m *Tsc2*^{+/-}: n = 5; 2 m wt/2 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,1264, 4 m wt/4 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,2924, 8 m wt/8 m *Tsc2*^{+/-}: p = 0,5441; t-Test)

3.4 Expressionsstudien von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen von acht bis neun Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen

IEGs sind zelluläre Marker, die Neuronen identifizieren, welche durch ein spezifisches Verhalten aktiviert wurden (Guzowski et al., 2001; Kubik et al., 2007) (vergleiche 1.4.1). In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die aktivitätsabhängigen Gene *zif268* und *c-Fos* verwendet, um die neuronale Plastizität von acht bis neun Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zu charakterisieren. Voraussetzung für die Expressionsanalyse von *zif268* und *c-Fos* mittels RT-qPCR (vergleiche 2.2.2.6) war eine erneute und kombinierte Durchführung des 24 h NORT und des 7 d NORT, die unter Punkt 2.2.1.3.5 detailliert beschrieben ist. Im Anschluss an die spezifischen Verhaltenstests wurden die Gehirne der acht bis neun Monate alten Versuchstiere entnommen, in RNA *later* inkubiert und nachfolgend wurde der Cortex, der PFC, der HC und DG präpariert. Nur nach dem 7 d NORT wurde auch der EC entnommen. Weiterhin wurde von allen Gehirnregionen die RNA isoliert (vergleiche 2.2.2.4) und in cDNA (vergleiche 2.2.2.5) umgeschrieben. Nach der Lernphase und dem 24 h NORT zeigten die Resultate der RT-qPCRs sowohl von *zif268* (Abb. 3.18 A1, A2) als auch von *c-Fos* (Abb. 3.18 B1, B2) für alle analysierten Gehirnregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und der wildtypischen Kontrollgruppe (Abb. 3.18 A1, A2). Die Analysen nach dem 7 d NORT präsentierten hingegen signifikante Unterschiede des Expressionslevels in den gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen. Für *zif268* war das relative Expressionslevel, welches gegen *Gapdh* normalisiert wurde, in den Gehirnregionen HC und DG von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 0,5 verringert. Cortex, PFC und EC von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigten im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen keine signifikant veränderte Expression (Abb. 3.18 A3). Für *c-Fos* war das relative Expressionslevel, welches ebenfalls gegen *Gapdh* normalisiert wurde, in den Gehirnregionen Cortex, PFC, HC und DG im Vergleich zu den Wildtypen signifikant verringert. Für den Cortex um 0,3, für den PFC um 0,45 und für den HC und den DG wurden jeweils ein verringertes Expressionslevel um 0,5 verzeichnet. Der EC zeigte jedoch im Gegensatz zu den wildtypischen Kontrollen keine signifikant veränderte Expression (Abb. 3.18 B3).

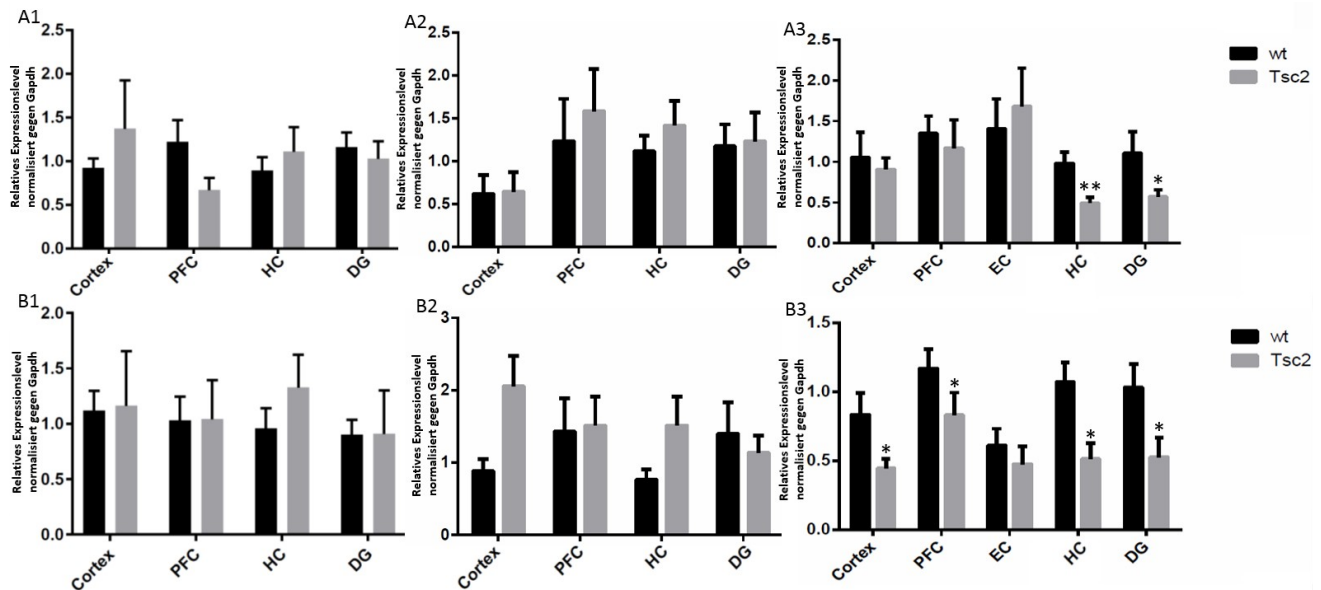


Abbildung 3.18: RT-qPCRs der aktivitätsabhängigen Gene *zif268* (A) und *cFos* (B) nach Lernphase (1), 24 Hours Novel Object Recognition Task (24 h NORT) (2) und Seven Days Novel Object Recognition Task (7 d NORT) (3).

- A) Nach der Lernphase (A1) und dem 24 h NORT (A2) zeigt die RT-qPCR für *zif268* für alle analysierten Gehirnregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen 8 m bis 9 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und der Kontrollgruppe. Der 7 d NORT (A3) präsentiert hingegen für *zif268* ein signifikant verringertes Expressionslevel in den Gehirnregionen HC und DG im Vergleich zu den wt. Cortex, PFC und EC zeigen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen keine signifikant veränderte Expression. (A1: C: wt: n = 7, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; PFC: wt: n = 5, *Tsc2*^{+/-}: n = 5; HC: wt: n = 8, *Tsc2*^{+/-}: n = 5; DG: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = > 0,999, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,1508, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,497, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = > 0,9999; A2: C: wt: n = 4, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; PFC: wt: n = 4, *Tsc2*^{+/-}: n = 5; HC: wt: n = 4, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; DG: wt: n = 5, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0571, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,4127, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,6095, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = > 0,9999; A3: C: wt: n = 5, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; PFC: wt: n = 10, *Tsc2*^{+/-}: n = 9; EC: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; HC: wt: n = 4, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; DG: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0573, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,2475, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0061, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0303; Mann-Whitney-U-Test)
- B) Nach der Lernphase (B1) und dem 24 h NORT (B2) zeigt die RT-qPCR für *c-Fos* in allen analysierten Gehirnregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen 8 m bis 9 m alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und Kontrollgruppen. Für *c-Fos* ist das relative Expressionslevel nach dem 7 d NORT (B3) in Cortex, PFC, HC und DG im Vergleich zu den wt signifikant verringert. Der EC beschreibt jedoch im Gegensatz zu den Kontrollen keine signifikant veränderte Expression. (B1: C: wt: n = 7, *Tsc2*^{+/-}: n = 3; PFC: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; HC: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; DG: wt: n = 5, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = > 0,999, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,7922, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,3660, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,3290; B2: C: wt: n = 3, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; PFC: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; HC: wt: n = 3, *Tsc2*^{+/-}: n = 6; DG: wt: n = 7, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0571, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,5368, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,1429, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,5979; B3: C: wt: n = 5, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; PFC: wt: n = 10, *Tsc2*^{+/-}: n = 9; EC: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 4; HC: wt: n = 4, *Tsc2*^{+/-}: n = 7; DG: wt: n = 6, *Tsc2*^{+/-}: n = 5; C wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0350, PFC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0435, HC wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0424, DG wt/*Tsc2*^{+/-}: p = 0,0303; Mann-Whitney-U-Test)

4. Diskussion

Die in dieser Dissertationsschrift bearbeiteten Fragestellungen basieren im Wesentlichen auf funktionelle Studien, die mit Mäusen durchgeführt wurden, und auf Untersuchungen des molekularen Mechanismus der Gehirnfunktion bei dem genetischen Syndrom TS, das sowohl mit kognitiven Störungen als auch mit autistischen Verhaltensweisen einhergehen kann. Zunächst sollte der verwendete Mausstamm B6;129S4-*Tsc2*^{tmDjk}/J in Verhaltensstudien charakterisiert werden, die sowohl das Sozial- und Angstverhalten bezüglich autistischer Verhaltensmuster, als auch die kognitive Leistung charakterisieren sollten. Weiterhin wurde die Frage geklärt, in welchem Alter die heterozygoten *Tsc2*-Mäuse potentielle autistische Verhaltensweisen und kognitive Defizite entwickeln. Zudem wurde analysiert, wie sich CSS auf den Phänotypen der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse auswirkt. Darüber hinaus wurden über Protein- und RNA-Expressionsanalysen die molekularen Mechanismen des gezeigten Phänotyps untersucht.

4.1 Verhaltensexperimente mit *Tsc2*^{+/-}-Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die *Tsc2*^{+/-}-Mauslinie in unterschiedlichen Altersgruppen und zudem geschlechtsspezifisch in ihrem Verhalten analysiert. Die erlangten Ergebnisse stellen die bislang veröffentlichten Daten zum Teil in Frage und eröffnen neue Perspektiven für translationale Forschungsansätze.

4.1.1 Vier Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Männchen zeigen autistische Verhaltensmuster

Ehninger et al. beschrieben erstmals im Jahre 2008, dass drei bis sechs Monate alte heterozygote *Tsc2*-Weibchen und Männchen (verwendeter Inzuchtstamm: C57BL/6NCrl) keine Auffälligkeiten in der sozialen Interaktion in dem *three chamber* -Test und auch kein erhöhtes Angstverhalten in dem *elevated plus maze* sowie dem *open field* -Test zeigen. Diese Resultate lassen zunächst darauf schließen, dass sich bei dieser Mauslinie kein autistischer Phänotyp einstellt. Im Gegensatz zu dieser Studie werden in der Literatur Defizite im Sozialverhalten in dem *dyadic reciprocal* und in dem *three-chamber social interaction* -Test von *Tsc2*^{+/-}-Männchen bereits im Alter von 30 bis 35 Tagen (verwendeter Inzuchtstamm: C57BL/6J, Tang et al., 2014) sowie bei *Tsc2*^{+/-}-Männchen und -Weibchen im Alter von acht

bis zehn Wochen (Inzuchtstamm: C57BL/6J, Sato et al., 2012) beschrieben. Tang et al. (2014) zeigten auch in weiteren Verhaltensversuchen, die den autistischen Phänotypen analysieren, dass *Tsc2*^{+/-}-Männchen im Alter von 30 bis 35 Tagen kein Angstverhalten in dem *open field* -Test und kein repetitives Verhalten in dem *self-grooming* -Test aufweisen. Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass sich autistische Verhaltensmuster der *Tsc2*^{+/-}-Männchen des Inzuchtstamms C57BL/6J zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat entwickeln. Zwei Monate alte männliche *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zeigten noch keine Beeinträchtigungen im Sozialverhalten, was sowohl in der sozialen Interaktion als auch im Nestbauverhalten analysiert werden konnte. Vier Monate alte Männchen wiesen hingegen signifikante Defizite auf (vergleiche 3.1.1). Weiterhin sind vier Monate alte männliche *Tsc2*^{+/-}-Mäuse tendenziell ängstlicher als die wildtypische Kontrollgruppe (vergleiche 3.1.2, Ergebnis statistisch nicht signifikant). Um sicher einen autistischen Phänotypen der in dieser Arbeit studierten heterozygoten *Tsc2*-Linie zu beweisen, sollten weitere Studien durchgeführt werden, die auf autistische Verhaltensweisen schließen lassen. Hierzu zählt beispielsweise der *open field* -Test, um das Angstverhalten der Mäuse näher zu analysieren. Der *self grooming* - sowie der *marble burying* -Test werden verwendet, um das repetitive Verhalten näher zu beschreiben (Chevere-Torres et al., 2012; Reith et al., 2013).

4.1.2 *Tsc2*^{+/-}-Männchen zeigen in unterschiedlichen Altersgruppen keine Beeinträchtigungen im Hippocampus-abhängigen Lernen

In der Literatur werden in unterschiedlichen Hippocampus-basierenden Tests kognitive Defizite von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen beschrieben (Ehninger et al., 2008; Tang et al., 2014). Ehninger et al. (2008) zeigten sowohl in dem MWM (Training über fünf Tage), als auch in dem *radial maze* -Test und bei der *contextual fear conditioning* in drei bis sechs Monate alten Weibchen und Männchen eine Beeinträchtigung im Hippocampus-abhängigen Lernen. Tang et al. (2014) publizierten hippocampale Defizite von 30 bis 35 Tagen alten *Tsc2*^{+/-}-Männchen in dem 30 min NORT. Die im Rahmen dieser Dissertation erlangten Daten konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. *Tsc2*^{+/-}-Männchen wurden im Alter von zwei, drei, vier und acht Monaten in unterschiedlichen Tests (YM, 2 min und 24 h NORT und MWM (Training über 10 Tage)) untersucht, für die eine HC-Beteiligung angenommen wird. Die Resultate zeigten in allen Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen heterozygoten *Tsc2*-Mäusen und deren Kontrollgruppen (vergleiche 3.1.3), was darauf schließen lässt, dass der HC von heterozygoten *Tsc2*-Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Diese Annahme war Gegenstand weiterer Analysen, die im Verlauf der vorliegenden Diskussion näher erläutert werden.

4.1.2.1 *Tsc2*^{+/-}-Mausmodelle und die Kontroversen der Literatur

Ein Vergleich der Daten zwischen den Veröffentlichungen von Ehninger et al. (2008), Sato et al. (2012), Tang et al. (2014) und der vorliegenden Arbeit zeigt in Bezug auf autistische Merkmale und der Hippocampus-basierenden kognitiven Leistung der heterozygoten *Tsc2*-Mäuse kontroverse Ergebnisse, die auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden können. Einen wichtigen Diskussionspunkt stellen die unterschiedlichen Testprotokolle dar, die sowohl von Ehninger et al. (2008) als auch von Sato et al. (2012) und Tang et al. (2014) im Vergleich zu den hier verwendeten Testprotokollen angewendet wurden (vergleiche 2.2.1). Weiterhin spielt das Geschlecht eine wesentliche Rolle. Verhaltensversuche, die mit Weibchen und Männchen durchgeführt werden, können aufgrund der weiblichen Hormonschwankungen zu heterogenen Ergebnissen führen (Boivin et al., 2017; Lisk et al., 1969; Tucker and McCabe, 2017). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich zeigen, ist das genaue Alter der zu untersuchenden Mäuse essentiell. Ehninger et al. (2008) analysierten nicht nur beide Geschlechter simultan in denselben Versuchen, sondern sie verwendeten zudem Tiere im Alter von drei bis sechs Monaten. Diese Faktoren könnten eine mögliche Begründung dafür sein, weshalb die in dieser Publikation aufgeführten Daten von denen der vorliegenden Arbeit abweichen. Zu erwähnen ist weiterhin, dass von Ehninger et al. (2008) ein C57BL/6N-Inzuchtstamm verwendet wurde. Unterschiedliche Inzuchtstämme und die Anzahl der Rückkreuzungen können ebenfalls zu einem abweichenden Verhalten der Versuchsmäuse führen. Auch die Ergebnisse von Tang et al. (2014) weisen Diskrepanzen gegenüber den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten auf. Diese Publikation beschreibt bereits für einen Monat alte *Tsc2*^{+/-}-Männchen Defizite im Sozialverhalten und eine kognitive Beeinträchtigung in dem 30 min NORT. Eine Hypothese für diesen verfrühten Phänotyp könnten unterschiedliche Störfaktoren während der Aufzucht sein. Rice et al. (2008) zeigten, dass chronischer Stress in einem sehr frühen Lebensalter zu einer Beeinträchtigung des Hippocampus-abhängigen Lernens und der Gedächtnisfunktion in älteren Mäusen führt (Rice et al., 2008). In Folge der vorliegenden Doktorarbeit werden in weiterführenden Studien die Auswirkungen von *early life stress* auf das *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell untersucht. Es ist zu vermuten, dass sich bedingt durch *early life stress* der *Tsc2*^{+/-}-Phänotyp bereits in einem früheren Lebensalter (< vier Monate) entwickeln könnte. Diese Ergebnisse könnten weitere Erklärungen über die breitgefächerte klinische Variabilität und einer vermutlich erhöhten Stressanfälligkeit von jungen TS-Patienten liefern.

4.1.3 Acht Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Männchen zeigen eine defizitäre Gedächtniskonsolidierung

Die unter Punkt 4.1.2 bereits diskutierten Daten zeigen, dass $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse keine Beeinträchtigungen in Hippocampus-abhängigen Lerntests aufweisen. Der HC ist jedoch nicht nur für das Abrufen von kürzlich gemachten Erfahrungen essentiell (Gafford et al., 2013), sondern spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle während der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses (Frankland and Bontempi, 2005; Takehara-Nishiuchi, 2014). Die Gedächtniskonsolidierung beruht auf Projektionen zwischen dem HC und dem entorhinalen sowie dem präfrontalen Cortex (vergleiche 1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Verhaltenstest durchgeführt, der die Gedächtniskonsolidierung im $Tsc2^{+/-}$ -Mausmodell charakterisiert. Der 7 d NORT wurde sowohl im Alter von drei Monaten als auch im Alter von acht Monaten durchgeführt (vergleiche 3.1.3.4). Die Resultate legen nahe, dass sich die kognitive Einschränkung im Mausmodell über die Zeit entwickelt und durch Defizite in der Gedächtniskonsolidierung begründet sein könnte. Drei Monate alte $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse zeigten in dem 7 d NORT noch keine Auffälligkeiten. Im Alter von acht Monaten war das Langzeitgedächtnis von $Tsc2^{+/-}$ -Männchen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen deutlich beeinträchtigt. Die $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse waren nicht mehr dazu fähig, sich über eine Woche an ein Objekt zu erinnern. Diese Ergebnisse wurden ergänzt durch eine *episodic memory battery*, die von J. Krummeich durchgeführt wurde. Das episodische Gedächtnis involviert ebenfalls sowohl den HC als auch den EC (VarghaKhadem, 1997). Das Experiment wurde im Alter von drei und zehn Monaten durchgeführt und zeigte signifikante Defizite in zehn Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Mäusen. Dieses Ergebnis widerspricht den Studien von Waltereit et al. (2006). In dieser Veröffentlichung wurde das episodische Gedächtnis von adulten $Tsc2^{+/-}$ -Ratten in dem MWM studiert und zeigte, dass die heterozygoten $Tsc2$ -Tiere signifikant besser episodische Gedächtnisleistungen erbrachten als die wildtypischen Kontrollen (Waltereit et al., 2006). Die in dieser Studie analysierten Ratten waren allerdings jünger, was in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen die Vermutung zulässt, dass die $Tsc2^{+/-}$ -Ratten für die Entwicklung kognitiver Defizite noch zu jung waren. An dieser Stelle sollen die hier erlangten Resultate aus der Trainingsphase des MWM aufgegriffen werden (vergleiche 3.1.3.2). Im Gegensatz zu den vier Monate alten Versuchstieren zeigten die acht Monate alten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse ein hyperfunktionelles Verhalten während der zweitägigen Trainingsphase, in der die sichtbare Plattform zu erklimmen war. Die heterozygoten $Tsc2$ -Tiere erreichten die Plattform signifikant schneller als die wildtypische

Kontrollgruppe. Das hyperfunktionelle Verhalten der *Tsc2*^{+/-}-Mauslinie und des *Tsc2*^{+/-}-Rattenmodells (Waltereit et al., 2006) könnte mit der Idee übereinstimmen, dass modifizierende Gene im genetischen Hintergrund die Ausbildung des TS-Phänotypen beeinflussen können (de Vries et al., 2007; Goorden et al., 2007; Onda et al., 1999). Weiterhin könnten auch eine progressive Phänotypentwicklung und intrazelluläre kompensatorische Effekte als mögliche Ursachen diskutiert werden. Eine Hyperfunktionalität wurde ebenfalls für ein Mausmodell der Huntington-Krankheit beschrieben (Luesse et al., 2001). Das hyperfunktionelle Verhalten dieser transgenen Mäuse setzt erst kurz vor der Phänotypentwicklung ein. Dies wurde mit der progressiven Entwicklung der striatalen Dysfunktion der Erkrankung erklärt. Basierend auf dieser Beobachtung könnte für das *Tsc2*^{+/-}-Rattenmodell (Waltereit et al., 2006) angenommen werden, dass eventuell der Phänotyp in einem späteren Lebensalter zu erwarten ist. Für das hier studierte *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell beeinflusst möglicherweise die defizitäre Gedächtniskonsolidierung den gleichaltrigen hyperfunktionellen Phänotypen, der sich während der Trainingsphase des Hippocampus-basierenden Tests einstellt. Wie zuvor beschrieben, involviert die Gedächtniskonsolidierung sowohl cortikale Regionen als auch den HC. Es ist denkbar, dass erste progressive Defekte des HC Einfluss nehmen und zu einem hyperfunktionellen Verhalten der heterozygoten *Tsc2*-Tiere führen könnten.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Testphase des MWM. Wie bereits erwähnt, ist der MWM ein Hippocampus-basierender Test. Die Testmäuse lernen über eine zehntägige Trainingsphase in welchem Quadranten des Schwimmbeckens sich eine rettende Plattform befindet. Am Tag zehn wird im direkten Anschluss an die letzte Trainingseinheit die Plattform entfernt und die Verweildauer der Mäuse in den jeweiligen Quadranten gemessen. Wildtypen und *Tsc2*^{+/-}-Mäuse, sowohl im Alter von drei als auch im Alter von acht Monaten, erinnerten sich Hippocampus-basierend an das kürzlich Erlernte und verweilten deutlich länger in dem Plattformquadranten als in den weiteren drei Quadranten des Schwimmbeckens. 16 Tage später wurde nur die Testphase unter genau den gleichen Bedingungen wiederholt. Zu diskutieren ist, ob dieser Versuchsablauf nicht als Hippocampus-basierend angesehen werden kann, sondern als ein Test anerkannt werden könnte, der die Gedächtniskonsolidierung beschreibt. Um sich an Erfahrungen zurück zu erinnern, wird Erlerntes über Konsolidierungsmechanismen unter Kontrolle des HC, EC und PFC in das Langzeitgedächtnis überführt (vergleiche Abb. 1.5). Die zuvor erläuterten Resultate zeigen eine signifikante Beeinträchtigung der Gedächtniskonsolidierung von acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen. Erwartungsgemäß sollten die Tiere also ebenso in dem

gedächtniskonsolidierenden MWM-Test beeinträchtigt sein. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Sowohl die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse, als auch die Wildtypen erinnerten sich nach 16 Tagen an die externen Markierungen und verbrachten signifikant mehr Zeit in dem Plattformquadranten. An dieser Stelle ist auf die Publikation von Gafford et al. (2013) zu verweisen. Diese Studie zeigt, dass eine längere beziehungsweise intensivere Trainingsphase, die im Rahmen eines Hippocampus-basierenden Tests durchgeführt wurde, die HC-Aktivität beeinflusst und, dass der HC also nicht nur bei dem Abrufen von kürzlich gemachten Erfahrungen involviert ist, sondern auch für das detaillierte, fehlerfreie Abrufen des Langzeitgedächtnisses. Diese Erkenntnisse könnten eine Erklärung dafür sein, warum der vermutlich gedächtniskonsolidierende MWM-Test von den acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren erfolgreich absolviert wurde, der 7 d NORT hingegen nicht. Um diese Annahme zu bestätigen, wird in weiteren Untersuchungen der 7 d NORT mit einer längeren Trainingsbeziehungsweise Lernphase erneut durchgeführt.

Zudem sind weitere Studien notwendig, um den genauen Zeitpunkt und damit das genaue Alter zu spezifizieren, in dem *Tsc2*^{+/-}-Mäuse Defizite in der Gedächtniskonsolidierung und im Erinnerungsvermögen entwickeln. Die Experimente, die für die vorliegende Doktorarbeit durchgeführt wurden, zeigen lediglich, dass das Erinnerungsvermögen von drei Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse über eine Woche fortbesteht. Im Alter von acht Monaten wurde nach einer Woche eine signifikante Beeinträchtigung des Erinnerungsvermögens festgestellt. Es ist also durchaus möglich, dass Probleme bei der Gedächtniskonsolidierung bereits vor Erreichen des achten Lebensmonats auftreten und Beeinträchtigungen des Erinnerungsvermögens schon nach weniger als sieben Tagen eintreten könnten. In einem vorangegangenen Versuch (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde ein 5 m NORT durchgeführt. Die erlangten Daten veranschaulichten erstmals, dass im Gegensatz zu den *Tsc2*^{+/-}-Mäusen, die wildtypischen Mäuse die Fähigkeit besitzen, sich über fünf Monate an ein bekanntes Objekt zu erinnern. Diese Studien legen nahe, dass Gedächtniskonsolidierungsmechanismen und somit das Erinnerungsvermögen in Versuchsmäusen hoch konserviert sind und Mäuse optimale Modelle bieten, um Gedächtniskonsolidierungsmechanismen zu studieren.

4.2 Verhaltensexperimente mit vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen nach chronisch-sozialem Stress (CSS)

Es wurde bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben, dass die mTOR-Signalkaskade bei Stress beziehungsweise bei der Ausbildung von mentaler Resilienz eine wesentliche Rolle spielt (Baldini et al., 2013; Harvey and Shahid, 2012; Li et al., 2010; Popoli et al., 2012; Schmidt et al., 2010; Taliáz et al., 2011). TS wird verursacht durch Mutationen in den Genen *TSC1* und/oder *TSC2*, was zu einer erhöhten Aktivität der mTOR-Signalkaskade führen kann (Garza-Lombo and Gonsebatt, 2016; Troca-Marin et al., 2012, vergleiche 1.3.1). TS-Patienten können bereits frühkindlich Autismus entwickeln. Dabei können Abweichungen von gewohnten Abläufen schon zu einer erhöhten Stresswahrnehmung führen (vergleiche 1.5). Um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss CSS auf ein Mausmodell hat, das einen hochregulierten mTOR-Signalweg aufweist und daraus resultierende autistische Verhaltensmuster zeigt, wurde in der vorliegenden Dissertation erstmals der Einfluss von CSS auf *Tsc2*^{+/-}-Mäuse studiert. Die vier Monate alten Tiere wurden nicht nur auf autistische Verhaltensänderungen nach CSS untersucht, sondern es wurde weiterhin die kognitive Leistung, die sensorische Funktion und eine mögliche Depressivität nach CSS analysiert (vergleiche 3.2).

Zunächst sollen die Verhaltensstudien nach CSS diskutiert werden, die mit dem autistischen Phänotypen zusammenhängen. Wie unter Punkt 4.1.1 bereits beschrieben, zeigen männliche heterozygote *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Alter von vier Monaten autistische Verhaltensmuster. Die soziale Interaktion und das Nestbauverhalten sind defizitär und das Angstverhalten ist deutlich erhöht. Nach CSS zeigten die gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse eine um 5 % höhere mentale Resilienz gegen Stress als die wildtypische CSS-Kontrollgruppe. Das widerlegt die Annahme, dass autistische TS-Kinder sensibler auf sozialen Stress reagieren könnten (vergleiche 1.5). Möglicherweise treten hier schon kompensatorische Effekte der mTOR-Signalkaskade ein, was in weiteren Studien über proteinanalytische Methoden analysiert werden soll. Dennoch zeigen die gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse eine signifikant verringerte soziale Interaktion, sowohl im Vergleich zu den ungestressten Wildtypen als auch im Vergleich zu den nicht gestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren. Dies lässt den Schluss zu, dass Mäuse mit einer heterozygoten *Tsc2*-Mutation auf CSS reagieren und genau wie die wildtypischen Kontrollen lernen sich von einem fremden Interaktionspartner fern zu halten. Das defizitäre Nestbauverhalten der vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tiere normalisiert sich nach CSS. Die Nestbauqualität war vergleichbar mit der von gestressten und ungestressten Wildtypen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass

möglicherweise molekulare Mechanismen das Verhalten einer *Tsc2*^{+/-}-Maus nach CSS kompensieren, um somit das Nestbauverhalten als Schutzfunktion zu verbessern. Das Hippocampus-basierende YM, der ebenfalls nach CSS durchgeführt wurde, zeigt eine augenscheinliche Verbesserung der kognitiven Leistung von gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Tieren. Möglicherweise zeigen gestresste, heterozygote *Tsc2*^{+/-}-Männchen jedoch keine bessere kognitive Leistung, sondern performen in dem YM-Test aufgrund des gestressten Zustands schneller. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte eine weitere Videoanalyse des Experiments durchgeführt werden.

Dass eine gestörte sensorische Funktion aufgrund eines gestörten Neurotransmittergleichgewichts in neuropsychiatrischen Erkrankungen auftreten kann, wurde bereits für Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie (Braff et al., 1978; Braff and Geyer, 1990; Cadenhead et al., 1993), mit Huntingtons's Disease (Swerdlow et al., 1995) oder Zwangsstörungen (Swerdlow et al., 1993) beschrieben. Mehr als 90 % der TS-Patienten zeigen neurologische Symptome (Jeste et al., 2008), was die Vermutung zulässt, dass auch diese Patienten eine gestörte sensorische Funktion haben könnten. Dieser Annahme zur Folge wurde der PPI-Test mit vier Monate alten gestressten und nicht gestressten heterozygoten *Tsc2*-Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse legten nahe, dass gestresste *Tsc2*^{+/-}-Tiere im Vergleich zu den gestressten Wildtypen eine signifikant niedrigere PPI, also eine höhere Schreckreaktion bei 70 dB aufzeigen. Verglichen mit den nicht gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen, wurde weiterhin für die gestressten *Tsc2*^{+/-}-Tiere eine deutlich höhere Schreckreaktion bei 70 dB beschrieben. In der Literatur wird eine veränderte PPI für zahlreiche Mausmodelle aufgeführt, die rezeporspezifische Mutationen tragen (Zusammengefasst in Geyer et al., 2002). Zudem wird eine erniedrigte PPI für ungestresste *Lrfrn2 knockout* Mäuse beschrieben (Morimura et al., 2017). LRFN2 ist ein PSD95-Interaktionsprotein. Mutationen in diesem Gen können zu Autismus, dissozialer Persönlichkeitsstörung und Lernschwierigkeiten führen. *Lrfrn2 knockout* Mäuse zeigen analog zu *Tsc2*^{+/-}-Mäusen autistische Verhaltensmuster, eine verbesserte Leistung in bestimmten hippocampalen Tests, Auffälligkeiten in der sensorischen Funktion und Abweichungen der AMPA- und NMDA-Rezeptoren. In der vorliegenden Dissertation wurden für nicht gestresste vier Monate alte, heterozygote *Tsc2*-Mäuse über proteinanalytische Methoden Auffälligkeiten der AMPA-Rezeptoren beschrieben. Sowohl in dem HC als auch in dem PFC und dem Cortex liegen signifikante Verschiebungen von GluA2 zu GluA1 vor (vergleiche 3.3). Auch wenn die erhöhte Schreckreaktion in dem *Tsc2*^{+/-}-Mausmodell erst nach CSS eintritt, weil möglicherweise durch den CSS eine erhöhte Ängstlichkeit vorhanden ist, könnte das verschobene Verhältnis von GluA1 zu GluA2

ursächlich für die gestörte sensorische Funktion sein. Weitere Studien sind notwendig, um die AMPA- als auch die NMDA-Rezeptoren in vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren nach CSS zu analysieren.

In einem weiteren Verhaltensversuch, der nach CSS durchgeführt wurde, sollte ein mögliches depressives Verhalten von chronisch gestressten und ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Tiere studiert werden. Die Resultate zeigen, dass sowohl gestresste als auch ungestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den gestressten Wildtypen ein signifikant erhöhtes depressives Verhalten aufweisen. Diese Erkenntnisse stehen in direktem Zusammenhang mit dem autistischen Phänotypen, der in dieser Doktorarbeit für vier Monate alte heterozygote *Tsc2*-Mäuse gezeigt werden konnte, und korreliert mit der Beobachtung, dass autistische Kinder eine erhöhte Neigung zu depressiven Verhaltensweisen aufzeigen (Spooren et al., 2012).

Zusammenfassend kann für die Verhaltensreihe nach CSS gesagt werden, dass CSS Einfluss auf den Phänotypen der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse nimmt. CSS führt bei einem Mausmodell mit heterozygoter *Tsc2*-Mutation zu einer verminderten sozialen Interaktion, zu einem depressiven Verhaltensmuster und einer erhöhten Schreckreaktion. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass sich autistische Verhaltensmuster nach CSS verstärken. Zudem führt CSS zu einem hyperfunktionellen Verhalten, beziehungsweise einer Leistungsverbesserung in dem Hippocampus-basierenden YM-Test und im Nestbauverhalten. Um zu analysieren, ob der sich nach CSS präsentierende *Tsc2*^{+/-}-Phänotyp einer erhöhten Aktivität des mTOR-Signalwegs zur Grunde liegen könnte, werden in weiterführenden Studien chronisch gestresste *Tsc2*^{+/-}-Mäuse mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin behandelt und erneut in ihrem Verhalten analysiert. Anzunehmen ist, dass sich das Verhalten von Rapamycin-behandelten, chronisch gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen dem der Vesikel-behandelten chronisch gestressten wildtypischen Kontrollen anpasst. Um die molekularen Mechanismen der mTOR-Signalkaskade bei CSS näher zu analysieren, werden weiterhin Western Blot-Analysen von Proteinen des mTOR-Signalwegs in unterschiedlichen Gehirnregionen von gestressten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und Kontrollen durchgeführt.

4.3 Der heterozygote *knockout* von *Tsc2* verursacht erste pathologische Veränderungen während der sehr frühen Gehirnentwicklung der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde der Fokus auf die neurologischen Symptome der TS gerichtet. Bei rund 90 % der Betroffenen entwickeln sich bereits frühkindlich neurologische Auffälligkeiten (Jeste et al., 2008) (vergleiche 1.3.1). Sowohl eine Intelligenzminderung als auch Autismus werden in direktem Zusammenhang mit der frühkindlichen Epilepsie (< 12 m) diskutiert (Bolton et al., 2002; Holmes and Stafstrom, 2007; Humphrey et al., 2014; Jozwiak et al., 2011). Eine groß angelegte Studie der Mayo Clinic Gomez mit 160 TS-Patienten zeigte, dass alle Patienten, die unter frühkindlichen epileptischen Anfällen litten eine mentale Retardierung entwickelten. TS-Betroffene, die keine frühkindlichen Krampfanfälle aufwiesen, hatten keine Intelligenzminderung (Jozwiak et al., 2011). Eine weiterführende Veröffentlichung von Jozwiak et al. (2011) beschreibt eine weitläufige Studie mit 45 Säuglingen mit einer sehr früh diagnostizierten TS und teilte diese Patienten in zwei Gruppen ein. Die Standardgruppe wurde nach Beginn der Krampfanfälle mit Vigabatrin behandelt. Bei der präventiven Gruppe wurde bereits mit der medikamentösen Behandlung begonnen, als erste aktive epileptische Entladungen in EEG-Untersuchungen beobachtet werden konnten, jedoch noch keine Krampfanfälle auftraten. Für die Standardgruppe konnte im Vergleich zu der präventiv behandelten Gruppe im Alter von zwei Jahren eine signifikant häufigere und deutlich ausgeprägtere mentale Retardierung diagnostiziert werden (48 % vs 14 %; IQ 69 vs 92). Zusammenfassend ist zu dieser Studie zu sagen, dass 52 % der TS-Patienten, die ab der ersten Woche nach dem ersten Anfallsleiden mit Vigabatrin behandelt wurden, einen normalen IQ zeigten. 86 % der TS-Kinder, die nach den ersten Auffälligkeiten der EEG-Untersuchungen behandelt wurden, zeigten im Alter von zwei Jahren einen normalen IQ. Diese Resultate werden in den Veröffentlichungen von Humphrey et al. (2014) und von Cusmai et al. (2011) untermauert (Cusmai et al., 2011; Humphrey et al., 2014). Für diese Studien sind jedoch sehr kritisch die Intelligenztests für Kleinkinder anzumerken, die von Jozwiak et al. (2011) mit dem *Psyche Cattell-Test* (Cattell, 1940), von Humphrey et al. (2014) mit dem *Mullen Scales of Early Learning* (Dumont et al., 2000) und von Cusmai et al. (2011) mit der *Griffith Mental Developmental Scale* (Griffith, 1966) durchgeführt wurden. Diese drei Methoden zur Beurteilung der frühkindlichen Intelligenz basieren im Wesentlichen auf unterschiedlichen Verhaltenstests, wie zum Beispiel der visuellen Wahrnehmung, der Objektmanipulation, der Vokalisierung, der Analyse von

Feinmotorik und motorischen Fertigkeiten, der Sprachwahrnehmung und -entwicklung, der sozialen Interaktion, der Augen- und Handkoordination und der praktischen Problembewältigung. In Frage zu stellen ist, ob eine Intelligenzminderung oder gar eine geistige Behinderung bereits frühkindlich zu diagnostizieren und die genannten Verhaltensmerkmale für eine sichere Diagnosestellung ausreichend sind.

Cusmai et al. (2011) erweiterten die Studien und zeigten, dass eine sehr frühe Kontrolle der Krampfanfälle nicht nur die mentale Retardierung aufhält, sondern auch Einfluss auf die Autismus-Inzidenz nimmt. 52 % der Kinder, die erst nach Auftreten der epileptischen Anfälle behandelt wurden, entwickelten eine Autismus-Spektrum-Störung. 91 % der Kinder, die in dieser Studie unmittelbar nach Anfallsbeginn behandelt wurden, entwickelten keine autistischen Verhaltensmuster (Cusmai et al., 2011).

Für die Entwicklung von Autismus und der Intelligenzminderung werden auch sogenannte Tubera (lat. Tuber = Vorwölbung) in der Gehirnrinde diskutiert (Bolton et al., 2002; Bolton and Griffiths, 1997; Holmes and Stafstrom, 2007). Bolton and Griffiths (1997) zeigten, dass sowohl TS-Patienten mit Intelligenzminderung als auch TS-Patienten mit Autismus eine signifikant höhere Anzahl an Tubera in dem Temporallappen aufwiesen als TS-Patienten ohne neurologische Symptome.

Die vorliegende Doktorarbeit beschreibt die progressive Phänotypentwicklung des heterozygoten *Tsc2*-Modells in unterschiedlichen Altersgruppen und legt nahe, dass sich in diesem Mausmodell autistische Verhaltensmuster zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat einstellen und, dass sich Defizite in der Gedächtniskonsolidierung erst zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln. *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zeigen vor dem Auftreten der ersten autistischen und kognitiven Symptome keine Krampfanfälle. Zudem sind keine Tubera in Gehirnen der betroffenen Mäuse zu erkennen. Das lässt darauf schließen, dass für die Ausprägung des Phänotyps weitere Defekte vorhanden sein könnten und die neurologischen Symptome nicht alleine auf die progressive Gehirnschädigung bei Epilepsie oder auf Tubera zurückzuführen sind. Proteinanalysen, die in corticalen Regionen während der frühen Gehirnentwicklung der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse durchgeführt wurden, zeigten eine signifikante Proteinabnahme von Tsc2 an E14,5, an P10 und an P17 (unpublizierte Daten J. Krummeich und S. Schweiger) und ebenfalls im Alter von zwei Monaten (vergleiche 3.3). Weiterhin wurden cortikale und hippocampale Proteinanalysen von älteren *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (vier und acht Monate) durchgeführt (Abb. 3.14). Diese Resultate zeigen, dass eine heterozygote *Tsc2*-Mutation in einem sehr frühen Stadium der Gehirnentwicklung zu einer gestörten Feinabstimmung der mTOR-Signalkaskade führt und somit eine entscheidende Rolle während

der späteren Phänotypentwicklung des *Tsc2*^{+/-}-Mausmodells spielen könnte. In älteren Mäusen scheint das Tsc2-Protein sowohl im Cortex als auch im PFC und im HC von dem anderen *Tsc2*-Allel kompensiert zu werden. Erwähnenswert ist, dass kein kompensatorischer Effekt in dem HC der acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse gefunden wurde, was möglicherweise zu den Gedächtniskonsolidierungsdefekten beitragen könnte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde von J. Krummeich, K. Rolski und D. Bassetti weiterhin der Fokus auf die sehr frühe Gehirnentwicklung von heterozygoten *Tsc2*^{+/-}-Tieren gelegt. Elektrophysiologische Untersuchungen des Cortex, die zunächst im Alter von P0 durchgeführt wurden, präsentierten signifikante Veränderungen des exzitatorischen postsynaptischen Stroms und der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten (unpublizierte Daten D. Bassetti und S. Kirischuk). Proteinanalysen von zehn Tage alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zeigten für das gesamte Cortexgewebe eine signifikante Reduktion der meisten Proteine der exzitatorischen, postsynaptischen Signaltransduktion (unpublizierte Daten J. Krummeich und S. Schweiger). Wohingegen ein kompensatorischer Effekte der meisten mTOR-Signalwegproteine in den corticalen Synaptosomen verzeichnet werden konnte (unpublizierte Daten K. Rolski und R. Schneider). Dieses Ergebnis wurde von der Untersuchung des *miniature excitatory postsynaptic current* (mEPSC) in dem mPFC von zehn Tage alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren und den wildtypischen Kontrollen untermauert. Das Ergebnis zeigte keine Unterschiede zwischen den analysierten Genotypen (unpublizierte Daten D. Bassetti und S. Kirischuk). Die corticalen Proteinanalysen, die im Alter von 17 Tagen in dem gesamten Gewebe der *Tsc2*^{+/-}-Tiere durchgeführt wurden, zeigten nun einen kompensatorischen Effekt der meisten Proteine des mTOR-Signalwegs und der exzitatorischen, postsynaptischen Signaltransduktion. Das Proteinlevel des präsynaptischen Proteins Snap25 war jedoch signifikant reduziert (unpublizierte Daten J. Krummeich und S. Schweiger). Die bislang analysierten Proteine der exzitatorischen, postsynaptischen Signaltransduktion in corticalen Synaptosomen von 17 Tage alten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zeigten eine signifikante Hochregulierung (unpublizierte Daten K. Rolski und R. Schneider), was von den elektrophysiologischen Untersuchungen des mEPSC in dem mPFC untermauert werden konnte. Diese Resultate präsentierten einen Anstieg der Amplitude der mEPSCs in *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und wiesen somit auf Auffälligkeiten der Postsynapse hin (unpublizierte Daten D. Bassetti und S. Kirischuk). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden weiterhin *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und deren wildtypische Kontrollgruppe im Lebensalter von 28 Tagen untersucht. Die Analysen der meisten corticalen mTOR-Signalwegproteine zeigten genau wie für P17 einen kompensatorischen Effekt. Jedoch wird für die 28 Tage alten Versuchstiere, im Gegensatz zu

den 17 Tage alten, keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten Genotypen für das präsynaptische Protein Snap25 verzeichnet.

Diese Resultate stimmten mit den Analysen der Elektrophysiologen überein und zeigten einen Anstieg in der Frequenz des mEPSCs in der Messung der Frequenz, was auf erste Auffälligkeiten der Präsynapse hinweisen könnte (unpublizierte Daten K. Rolski und R. Schneider). Analysen von mTOR-Signalwegproteinen der corticalen Synaptosomen der 28 Tage alten *Tsc2^{+/-}*-Mäuse und deren Kontrollen lagen zum Zeitpunkt der abgeschlossenen Doktorarbeit noch nicht vor.

Zusammenfassend ist an dieser Stelle zu sagen, dass diese Daten die Vermutung zulassen, dass der sich schrittweise entwickelnde TS-Phänotyp aus ersten neuronalen Veränderungen während der sehr frühen Gehirnentwicklung resultiert. Es ist anzunehmen, dass sich die neuronalen Dysfunktionen über die Zeit summieren und sich zunehmend pathologisch auf die neuronalen Netzwerke auswirken.

Von zukünftigen medikamentösen Behandlungen der *Tsc2^{+/-}*-Mäuse, die bereits in einem sehr frühen postnatalen Stadium (< Tag 10) begonnen werden sollen, wird ein weiterer Erkenntnisgewinn über die Auswirkungen der frühen pathologischen Gehirnveränderungen auf den zeitversetzt eintretenden Phänotypen erhofft. Es wird über die Medikamente Rapamycin oder Vigabatrin diskutiert. Vigabatrin hat den Vorteil, dass es nicht nur das GABA-abbauende Enzym GABA-Aminotransferase inhibiert und somit Krampfanfällen vorbeugt (Hsieh et al., 2016; Julich and Sahin, 2014), sondern der Wirkstoff hemmt zudem die Aktivität der mTOR-Signalkaskade (Zhang et al., 2013).

In weiterführenden Studien wären EEG-Untersuchungen der jungen *Tsc2^{+/-}*-Tiere denkbar. Möglicherweise könnten ebenfalls erste aktive epileptische Entladungen die frühe Gehirnentwicklung der jungen *Tsc2^{+/-}*-Mäuse schädigen. Zu erwähnen ist, dass im Rahmen der Verhaltensexperimente bei einzelnen *Tsc2^{+/-}*-Mäusen, die älter als acht Monate waren, Krampfanfälle auftraten. Diese Mäuse wurden sofort von dem Versuch ausgeschlossen und abgetötet. Zu vermuten ist, dass die Reizschwelle für einen epileptischen Anfall in älteren *Tsc2^{+/-}*-Mäusen bereits erniedrigt ist und die Aufregung des Verhaltensexperiments die Krampfanfälle auslösten.

4.4 Zwei bis acht Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zeigen eine Akkumulation von Proteinen der mTOR-Signalkaskade in hippocampalen und cortikalen Gehirnregionen

Proteinanalysen, welche im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, zeigten entweder einen kompensatorischen Effekt oder eine Akkumulation der mTOR-Signalwegproteine PSD95, GluA1, GluA2, S6 und pS6 in älteren *Tsc2*^{+/-}-Mäusen (vergleiche 3.3). Anzunehmen wäre, dass viele Zellen des Cortex, PFC und HC in älteren *Tsc2*^{+/-}-Mäusen nicht mehr dazu befähigt sind, die primären Gendefekte zu kompensieren. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation dieser Proteine, was möglicherweise die progressive und späte Phänotypentwicklung der *Tsc2*^{+/-}-Mäuse erklären könnte. Zu vermuten ist weiterhin, dass die Akkumulation der mTOR-Proteine in den einzelnen Zellen der betroffenen Gehirnregionen unterschiedlich schnell stattfindet, was die hohe klinische Variabilität der neurologischen Symptome von TS-Patienten erklären könnte.

Untermauert wurden diese Resultate mit den cortikalen Proteinanalysen der Synaptosomen (unpublizierte Daten K. Rolski und R. Schneider). Hier wurden insbesondere eine Hochregulierung von GluA1 im Verhältnis zu GluA2 in corticalen Synaptosomen der vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verzeichnet und die Vermutung bestärkt, dass sich die Verhaltensdefizite, welche sich ab dem vierten Lebensmonat zunächst in der sozialen Interaktion der *Tsc2*^{+/-}-Tiere äußern, durch eine Proteinakkumulation manifestiert werden.

4.5 Acht bis neun Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse zeigen eine reduzierte Expression von aktivitätsabhängigen Genen in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen

Basierend auf den Resultaten, die aus den kognitiven Verhaltenstests in dieser Doktorarbeit erlangt wurden, darf die Annahme formuliert werden, dass die Intelligenzminderung in TS-Patienten auf Defizite in der Gedächtniskonsolidierung zurückzuführen sein könnte (vergleiche 3.1.3). Um diese Vermutung zu bestätigen und den zugrunde liegenden Mechanismus zu erklären, wurden zunächst Expressionsstudien mit den aktivitätsabhängigen Genen *zif268* und *c-Fos* durchgeführt. *zif268* und *c-Fos* zählen zu den IEGs, die nach einem spezifischen Verhalten die Neuronen in aktivierten Gehirnregionen identifizieren und somit als zelluläre Marker genutzt werden können (Guzowski et al., 2001; Kubik et al., 2007)

(vergleiche 1.4.1). Für dieses Vorhaben wurde eine kombinierte Durchführung des 24 h NORT (vermutlich Hippocampus-basierend) und des 7 d NORT (basierend auf der Analyse der Gedächtniskonsolidierung) (vergleiche 2.2.1.3.4) angewendet. Sowohl nach der zweitägigen Lernphase als auch nach dem 24 h NORT und dem 7 d NORT wurden die Versuchstiere für die Gehirnentnahme abgetötet. Für die Expressionsanalysen wurden die gedächtnisbildenden Gehirnregionen Cortex, PFC, EC, HC und DG präpariert (vergleiche 1.4). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe spiegeln die zuvor erzielten Resultate aus Verhaltensanalysen des 24 h NORT und des 7 d NORT wider. Ab dem achten Lebensmonat zeigten *Tsc2*^{+/-}-Mäuse signifikante Verhaltensdefizite während der 7 d NORT-*challenge*. Der 24 h NORT wurde hingegen problemlos gemeistert. Die Expressionsanalysen zeigten sowohl für das IEG *zif268* als auch für das IEG *c-Fos* nach dem 24 h NORT in keiner analysierten Gehirnregion signifikante Expressionsunterschiede zwischen acht bis neun Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und der Kontrollgruppe (vergleiche 3.4). Gleiches wurde für die Expressionsanalysen dargestellt, welche nach der Lernphase durchgeführt wurden. Die Lernphase sollte in diesem Versuch als Kontrolle dienen. Während dieser zweitägigen Versuchsphase lernten die Versuchstiere zwei identische Objekte kennen. An Tag zwei sollten sich die Tiere also an die Objekte erinnern und somit keinem neuen Reiz ausgesetzt sein, was die Expression der IEGs also nicht beeinflussen sollte. Für die hier diskutierte Versuchsreihe ist der Vergleich zwischen Wildtyp und *Tsc2*^{+/-}-Maus von Bedeutung. In einer weiterführenden Auswertung wäre eine Gegenüberstellung der Wildtypen interessant. Zu erwarten wäre eine erhöhte Expression von *zif268* und *c-Fos*, sowohl nach dem 24 h NORT als auch nach dem 7 d NORT im Vergleich zu der Lernphase, da ein neues Objekt, also ein neuer Stimulus zu einer erhöhten Expression der IEGs führen kann (Barbosa et al., 2013).

Die Expressionsanalysen, die nach der 7 d NORT-*challenge* durchgeführt wurden, zeigten signifikante Unterschiede zwischen acht bis neun Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und deren Kontrollgruppen in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen. Für das aktivitätsabhängige Gen *zif268* wurde jedoch nur eine signifikante Reduktion der Expression in dem HC und dem DG von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verzeichnet. Cortex, PFC und EC zeigten kein verändertes Expressionslevel. Die Expression von *c-Fos* war hingegen in Cortex, PFC, HC und DG von *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant verringert. Auch die *c-Fos*-Expressionsanalyse zeigte in dem EC der *Tsc2*^{+/-}-Tiere keine reduzierte Expression. An dieser Stelle ist zu diskutieren, dass die differenzielle IEG-Expression nicht dem gleichen Schema folgt. *zif268* und *c-Fos* sind zwar beide an Prozessen der neuronalen Plastizität beteiligt, dennoch unterliegen sie unterschiedlichen biochemischen Wegen (Bisler et al., 2002; Davis et

al., 2003) und somit wahrscheinlich auch unterschiedlichen Funktionen. Grundsätzlich wird die Aktivierung von *c-Fos* nach einer Exposition gegenüber neuartigen Reizen beschrieben (Chaudhuri et al., 2000). Die Aktivierung von *zif268* wird in Zusammenhang mit einer anhaltenden synaptischen Stimulation diskutiert (Chaudhuri et al., 2000). Diese Annahme könnte eine Erklärung dafür sein, dass die *c-Fos*-Aktivität in Versuchen, die auf neuartige Reize, also zum Beispiel einem neuen Objekt basieren, besser angesprochen hat als die Aktivität von *zif268*. Es wäre ein weiterer Versuch denkbar, in dem eine intensivere Lernphase für den 7 d NORT durchgeführt wird. Möglicherweise würde dies zu einer stärkeren und gleichmäßigeren Aktivierung von *zif268* führen. Kontrovers zu dieser Erklärung zeigt die Publikation von Barbosa et al. (2013), dass sowohl *c-Fos* als auch *zif268* ein verändertes Expressionsmuster nach der Durchführung von Lernaufgaben aufweisen, die mit einer Objektwiedererkennung in Verbindung stehen (Barbosa et al., 2013).

Zusammenfassend gibt diese Versuchsreihe anhand der Expressionsmuster der aktivitätsabhängigen Gene *zif268* und *c-Fos* einen eindeutigen Hinweis darauf, dass in gedächtniskonsolidierenden Gehirnregionen von acht bis neun Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Mäusen Defekte vorliegen. Für eine weitere Charakterisierung der erlangten Resultate wäre die Analyse einer weiteren Gehirnregion, die nicht in die Gedächtniskonsolidierung involviert ist, interessant.

In der Einleitung dieser Dissertationsschrift wird detailliert auf Gedächtniskonsolidierungsmechanismen eingegangen und beschrieben, dass Projektionen zwischen den Gehirnregionen des PFC, des Cortex, des EC und des HC, einschließlich des DG eine bedeutende Rolle während Lernprozessen, der Konsolidierung und auch während einem Erinnerungsabruf spielen (vergleiche 1.4). Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen geben einen Hinweis darauf, dass die Gehirnregionen Cortex, PFC, HC und DG nach einem gedächtniskonsolidierenden Lerntest Auffälligkeiten beziehungsweise Abweichungen vor allem in dem *c-Fos*-Expressionslevel im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen aufzeigen. In dem EC der *Tsc2^{+/-}*-Tiere ist weder die *zif268*- noch die *c-Fos*-Aktivität beeinträchtigt, was darauf hinweist, dass die defizitäre Gedächtniskonsolidierung nicht von dieser Gehirnregion ausgehen könnte. Der EC, der als „Torwächter“ des kortikalen Gedächtnisnetzwerkes angesehen wird, soll in weiteren Studien dennoch berücksichtigt werden, weil diese Gehirnregion dazu befähigt ist, selektiv mit dem HC oder mit dem mPFC in Abhängigkeit von dem Alter der Erinnerungen zu interagieren und somit für die Gedächtniskonsolidierung und für den Abruf von Erinnerungen eine bedeutende Rolle spielt (vergleiche 1.4, Takehara-Nishiuchi, 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen soll der

Vermutung nachgegangen werden, dass *Tsc2*^{+/-}-Tiere ab dem achten Lebensmonat Projektionsdefizite zwischen hippocampalen und corticalen Gehirnregionen aufweisen könnten. Aufgrund dieser Hypothese werden derzeit projektionsanalytische Versuche durchgeführt. Hierfür bekommt jede Versuchsmaus während einem operativen Eingriff Injektionen in den HC und den EC, jeweils in eine Hemisphäre. Die injizierten Substanzen sind Alexa-Farbstoffe, die jeweils an ein Cholera-Toxin gekoppelt sind und somit nach Injektion retrograd zum Zellkern einer Nervenzelle transportiert werden, was die Analyse von spezifischen Projektionen beziehungsweise Projektionsdefiziten im Gehirn eines Versuchstieres zulässt (Conte et al., 2009). Zudem wird erneut der 7 d NORT mit drei bis vier und acht Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren und Wildtypen durchgeführt, um im Anschluss die Proteine des mTOR-Signalweges zu analysieren. Wie einleitend beschrieben, spielt der mTOR-Signalweg ebenfalls eine bedeutende Rolle während der Gedächtniskonsolidierung (vergleiche 1.4). Aufgrund der in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse, könnte davon ausgegangen werden, dass eine mögliche Stimulierung der mTOR-Signalproteine nach dem gedächtniskonsolidierenden 7 d NORT in drei bis vier Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Tieren noch unbeeinträchtigt sein könnte. Acht Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse könnten vermutlich Auffälligkeiten der mTOR-Signalwegproteine zeigen. Diese Analysen könnten auf molekularer Ebene einen weiteren Aufschluss über die defiziente Gedächtniskonsolidierung geben, die im Rahmen dieser Doktorarbeit für acht Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Mäuse gezeigt werden konnte.

5. Literaturverzeichnis

Albasser, M.M., Poirier, G.L., and Aggleton, J.P. (2010). Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *European Journal of Neuroscience* 31, 134-147.

Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., and Bear, M.F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 480, 63-68.

Baldini, S., Restani, L., Baroncelli, L., Coltelli, M., Franco, R., Cenni, M.C., Maffei, L., and Berardi, N. (2013). Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 11715-11723.

Barbosa, F.F., Santos, J.R., Meurer, Y.S., Macedo, P.T., Ferreira, L.M., Pontes, I.M., Ribeiro, A.M., and Silva, R.H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Front Behav Neurosci* 7, 112.

Barker, G.R.I., and Warburton, E.C. (2011). When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *Journal of Neuroscience* 31, 10721-10731.

Bassell, G.J., and Warren, S.T. (2008). Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *Neuron* 60, 201-214.

Basu, J., and Siegelbaum, S.A. (2015). The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Csh Perspect Biol* 7.

Bateup, H.S., Johnson, C.A., Deneffrio, C.L., Saulnier, J.L., Kornacker, K., and Sabatini, B.L. (2013). Excitatory/inhibitory synaptic imbalance leads to hippocampal hyperexcitability in mouse models of tuberous sclerosis. *Neuron* 78, 510-522.

Bekinschtein, P., Katze, C., Slipczuk, L.N., Igaz, L.M., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 87, 303-307.

Bilsland, J.G., Wheeldon, A., Mead, A., Znamenskiy, P., Almond, S., Waters, K.A., Thakur, M., Beaumont, V., Bonnert, T.P., Heavens, R., et al. (2008). Behavioral and neurochemical

alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacol* 33, 685-700.

Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J.H., Zilles, K., and Staiger, J.F. (2002). Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat* 23, 187-198.

Bliss, T.V.P., and Collingridge, G.L. (1993). A Synaptic Model of Memory - Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Bockaert, J., and Marin, P. (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol Rev* 95, 1157-1187.

Bohme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A., and Blanchard, J.C. (1991). Possible Involvement of Nitric-Oxide in Long-Term Potentiation. *Eur J Pharmacol* 199, 379-381.

Boivin, J.R., Piekarski, D.J., Wahlberg, J.K., and Wilbrecht, L. (2017). Age, sex, and gonadal hormones differently influence anxiety- and depression-related behavior during puberty in mice. *Psychoneuroendocrino* 85, 78-87.

Bolton, P.F., and Griffiths, P.D. (1997). Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet* 349, 392-395.

Bolton, P.F., Park, R.J., Higgins, J.N.P., Griffiths, P.D., and Pickles, A. (2002). Neuro-epileptic determinants of autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Brain* 125, 1247-1255.

Braff, D., Stone, C., Callaway, E., Geyer, M., Glick, I., and Bali, L. (1978). Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15, 339-343.

Braff, D.L., and Geyer, M.A. (1990). Sensorimotor Gating and Schizophrenia - Human and Animal-Model Studies. *Arch Gen Psychiat* 47, 181-188.

Brooks-Kayal, A. (2010). Epilepsy and autism spectrum disorders: are there common developmental mechanisms? *Brain Dev* 32, 731-738.

Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., and Sakmann, B. (1995). Fractional Calcium Currents through Recombinant Glur Channels of the Nmda, Ampa and Kainate Receptor Subtypes. *J Physiol-London* 485, 403-418.

- Cadenhead, K.S., Geyer, M.A., and Braff, D.L. (1993). Impaired Startle Prepulse Inhibition and Habituation in Patients with Schizotypal Personality-Disorder. *Am J Psychiat* 150, 1862-1867.
- Canto, C.B., Wouterlood, F.G., and Witter, M.P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* 2008, 381243.
- Caroni, P., Donato, F., and Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci* 13, 478-490.
- Cattell, P. (1940). The measurement of intelligence of infants and young children (New York, N.Y.,: The Psychological Corporation).
- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., and Ye, F.C. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp* 60, 403-410.
- Chen, J., Alberts, I., and Li, X. (2014). Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci* 35, 35-41.
- Chevere-Torres, I., Maki, J.M., Santini, E., and Klann, E. (2012). Impaired social interactions and motor learning skills in tuberous sclerosis complex model mice expressing a dominant/negative form of tuberin. *Neurobiol Dis* 45, 156-164.
- Cho, Y.H., Beracochea, D., and Jaffard, R. (1993). Extended Temporal Gradient for the Retrograde and Anterograde Amnesia Produced by Ibotenate Entorhinal Cortex Lesions in Mice. *Journal of Neuroscience* 13, 1759-1766.
- Clark, R.E., Broadbent, N.J., Zola, S.M., and Squire, L.R. (2002). Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *Journal of Neuroscience* 22, 4663-4669.
- Cleary, C., Linde, J.A., Hiscock, K.M., Hadas, I., Belmaker, R.H., Agam, G., Flaisher-Grinberg, S., and Einat, H. (2008). Antidepressive-like effects of rapamycin in animal models: Implications for mTOR inhibition as a new target for treatment of affective disorders. *Brain Res Bull* 76, 469-473.
- Conte, W.L., Kamishina, H., and Reep, R.L. (2009). Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nature protocols* 4, 1157-1166.

- Countryman, R.A., Kaban, N.L., and Colombo, P.J. (2005). Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiology of Learning and Memory* 84, 175-183.
- Crino, P.B., Nathanson, K.L., and Henske, E.P. (2006). The tuberous sclerosis complex. *New Engl J Med* 355, 1345-1356.
- Cusmai, R., Moavero, R., Bombardieri, R., Vigevano, F., and Curatolo, P. (2011). Long-term neurological outcome in children with early-onset epilepsy associated with tuberous sclerosis. *Epilepsy Behav* 22, 735-739.
- Darnell, J.C., Van Driesche, S.J., Zhang, C.L., Hung, K.Y.S., Mele, A., Fraser, C.E., Stone, E.F., Chen, C., Fak, J.J., Chi, S.W., *et al.* (2011). FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell* 146, 247-261.
- Davis, S., Bozon, B., and Laroche, S. (2003). How necessary is the activation of the immediate early gene zif 268 in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res* 142, 17-30.
- de Vries, P.J. (2010). Targeted Treatments for Cognitive and Neurodevelopmental Disorders in Tuberous Sclerosis Complex. *Neurotherapeutics* 7, 275-282.
- de Vries, P.J., Hunt, A., and Bolton, P.F. (2007). The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC) - A postal survey of UK families. *Eur Child Adoles Psy* 16, 16-24.
- Deacon, R.M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature protocols* 1, 1117-1119.
- Der-Avakian, A., Mazei-Robison, M.S., Kesby, J.P., Nestler, E.J., and Markou, A. (2014). Enduring deficits in brain reward function after chronic social defeat in rats: susceptibility, resilience, and antidepressant response. *Biol Psychiatry* 76, 542-549.
- Dias, R., Robbins, T.W., and Roberts, A.C. (1996). Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature* 380, 69-72.
- Dragunow, M. (1996). A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 26, 293-299.
- Dumont, R., Cruse, C.L., Alfonso, V., and Levine, C. (2000). Mullen scales of early learning: AGS Edition. *J Psychoeduc Assess* 18, 381-389.

- Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D.J., Ramesh, V., and Silva, A.J. (2008). Reversal of learning deficits in a *Tsc2*^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med* *14*, 843-848.
- Ehninger, D., and Silva, A.J. (2011). Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and Autism spectrum disorders. *Trends Mol Med* *17*, 78-87.
- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience* *15*, 732-744.
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats .1. Behavioral-Data. *Behav Brain Res* *31*, 47-59.
- Erbayat-Altay, E., Zeng, L.H., Xu, L., Gutmann, D.H., and Wong, M. (2007). The natural history and treatment of epilepsy in a murine model of tuberous sclerosis. *Epilepsia* *48*, 1470-1476.
- Fattori, R., and Piva, T. (2003). Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* *361*, 247-249.
- Fenn, K.M., Nusbaum, H.C., and Margoliash, D. (2003). Consolidation during sleep of perceptual learning of spoken language. *Nature* *425*, 614-616.
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L.E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., *et al.* (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking *c-fos* in the CNS. *Journal of Neuroscience* *23*, 9116-9122.
- Fortin, D.A., Srivastava, T., Dwarakanath, D., Pierre, P., Nygaard, S., Derkach, V.A., and Soderling, T.R. (2012). Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *32*, 8127-8137.
- Foss-Feig, J.H., Adkinson, B.D., Ji, J.L., Yang, G., Srihari, V.H., McPartland, J.C., Krystal, J.H., Murray, J.D., and Anticevic, A. (2017). Searching for Cross-Diagnostic Convergence: Neural Mechanisms Governing Excitation and Inhibition Balance in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *Biol Psychiatry* *81*, 848-861.

Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.

Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., and Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881-883.

Gafford, G.M., Parsons, R.G., and Helmstetter, F.J. (2013). Memory accuracy predicts hippocampal mTOR pathway activation following retrieval of contextual fear memory. *Hippocampus* 23, 842-847.

Gais, S., and Born, J. (2004). Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2140-2144.

Garza-Lombo, C., and Gonsebatt, M.E. (2016). Mammalian Target of Rapamycin: Its Role in Early Neural Development and in Adult and Aged Brain Function. *Front Cell Neurosci* 10, 157.

Geyer, M.A., McIlwain, K.L., and Paylor, R. (2002). Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Mol Psychiatr* 7, 1039-1053.

Goorden, S.M.I., van Woerden, G.M., van der Weerd, L., Cheadle, J.P., and Elgersma, Y. (2007). Cognitive deficits in *Tsc1(+/-)* mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann Neurol* 62, 648-655.

Griffiths R., revised by Huntley, M. (1996). *The Griffiths Mental Development Scale from birth to 2 years*. Oxford, Hogrefe Ltd.

Guzowski, J.F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86-104.

Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., and McGaugh, J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *Journal of Neuroscience* 21, 5089-5098.

Haist, F., Gore, J.B., and Mao, H. (2001). Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nat Neurosci* 4, 1139-1145.

- Hanley, J.G. (2008). AMPA receptor trafficking pathways and links to dendritic spine morphogenesis. *Cell Adhes Migr* 2, 276-282.
- Harvey, B.H., and Shahid, M. (2012). Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacol Biochem Behav* 100, 775-800.
- Hawkins, R.D., Son, H., and Arancio, O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Nitric Oxide in Brain Development, Plasticity and Disease* 118, 155-172.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., and Malinow, R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262-2267.
- Henley, J.M., and Wilkinson, K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 17, 337-350.
- Hoge, J., and Kesner, R.P. (2007). Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiology of Learning and Memory* 88, 225-231.
- Holmes, G.L., and Stafstrom, C.E. (2007). Tuberous sclerosis complex and epilepsy: Recent developments and future challenges. *Epilepsia* 48, 617-630.
- Hsieh, D.T., Whiteway, S.L., Rohena, L.O., and Thiele, E.A. (2016). Tuberous sclerosis complex Five new things. *Neurol-Clin Pract* 6, 339-347.
- Huang, E.P. (1997). Synaptic plasticity: A role for nitric oxide in LTP. *Current Biology* 7, R141-R143.
- Humphrey, A., MacLean, C., Ploubidis, G.B., Granader, Y., Clifford, M., Haslop, M., Neville, B.G.R., Yates, J.R.W., Bolton, P.F., and Grp, T.S.S. (2014). Intellectual development before and after the onset of infantile spasms: A controlled prospective longitudinal study in tuberous sclerosis. *Epilepsia* 55, 108-116.
- Humphrey, A., Williams, J., Pinto, E., and Bolton, P.F. (2004). A prospective longitudinal study of early cognitive development in tuberous sclerosis - A clinic based study. *Eur Child Adoles Psy* 13, 159-165.

- Iseki, E., Marui, W., Kosaka, K., Akiyama, H., Ueda, K., and Iwatsubo, T. (1998). Degenerative terminals of the perforant pathway are human alpha-synuclein-immunoreactive in the hippocampus of patients with diffuse Lewy body disease. *Neurosci Lett* 258, 81-84.
- Jeste, S.S., Sahin, M., Bolton, P., Ploubidis, G.B., and Humphrey, A. (2008). Characterization of autism in young children with tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 23, 520-525.
- Jones, A.C., Daniells, C.E., Snell, R.G., Tachataki, M., Idziaszczyk, S.A., Krawczak, M., Sampson, J.R., and Cheadle, J.P. (1997). Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6, 2155-2161.
- Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V.P., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience* 4, 289-296.
- Jozwiak, S., Kotulska, K., Domanska-Pakiela, D., Lojszczyk, B., Syczewska, M., Chmielewski, D., Dunin-Wasowicz, D., Kmiec, T., Szymkiewicz-Dangel, J., Kornacka, M., *et al.* (2011). Antiepileptic treatment before the onset of seizures reduces epilepsy severity and risk of mental retardation in infants with tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neuro* 15, 424-431.
- Julich, K., and Sahin, M. (2014). Mechanism-based treatment in tuberous sclerosis complex. *Pediatr Neurol* 50, 290-296.
- Kaczmarek, L. (1993). Molecular-Biology of Vertebrate Learning - Is C-Fos a New Beginning. *J Neurosci Res* 34, 377-381.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). MTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, J.J., and Fanselow, M.S. (1992). Modality-Specific Retrograde-Amnesia of Fear. *Science* 256, 675-677.
- Kitamura, T., Macdonald, C.J., and Tonegawa, S. (2015). Entorhinal-hippocampal neuronal circuits bridge temporally discontinuous events. *Learn Memory* 22, 438-443.

- Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* 139, 814-827.
- Kristof, A.S., Li, P.Z., Major, P., and Landry, J.S. (2015). Lymphangioliomyomatosis and Tuberous Sclerosis Complex in Quebec Prevalence and Health-care Utilization. *Chest* 148, 444-449.
- Kubik, S., Miyashita, T., and Guzowski, J.F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem* 14, 758-770.
- Langston, R.F., and Wood, E.R. (2010). Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus* 20, 1139-1153.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274-293.
- Lasarge, C.L., and Danzer, S.C. (2014). Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front Mol Neurosci* 7, 18.
- Lee, S.H., Simonetta, A., and Sheng, M. (2004). Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* 43, 221-236.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., and Duman, R.S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.
- Lipton, J.O., and Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron* 84, 275-291.
- Lisk, R.D., Pretlow, R.A., and Friedman, S.M. (1969). Hormonal Stimulation Necessary for Elicitation of Maternal Nest-Building in Mouse (*Mus-Musculus*). *Anim Behav* 17, 730-&.
- Liu, E.B., Knutzen, C.A., Krauss, S., Schweiger, S., and Chiang, G.G. (2011). Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8680-8685.
- Lozovaya, N., Gataullina, S., Tsintsadze, T., Tsintsadze, V., Pallesi-Pocachard, E., Minlebaev, M., Goriounova, N.A., Buhler, E., Watrin, F., Shityakov, S., *et al.* (2014).

Selective suppression of excessive GluN2C expression rescues early epilepsy in a tuberous sclerosis murine model. *Nature communications* 5.

Luesse, H.G., Schiefer, J., Spruenken, A., Puls, C., Block, F., and Kosinski, C.M. (2001). Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* 126, 185-195.

Ma, X.J.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Bio* 10, 307-318.

MacGillavry, H.D., Song, Y., Raghavachari, S., and Blanpied, T.A. (2013). Nanoscale Scaffolding Domains within the Postsynaptic Density Concentrate Synaptic AMPA Receptors. *Neuron* 78, 615-622.

Mcclelland, J.L., Mcnaughton, B.L., and Oreilly, R.C. (1995). Why There Are Complementary Learning-Systems in the Hippocampus and Neocortex - Insights from the Successes and Failures of Connectionist Models of Learning and Memory. *Psychol Rev* 102, 419-457.

McDonald, B., Highley, J.R., Walker, M.A., Herron, B.M., Cooper, S.J., Esiri, M.M., and Crow, T.J. (2000). Anomalous asymmetry of fusiform and parahippocampal gyrus gray matter in schizophrenia: A postmortem study. *Am J Psychiat* 157, 40-47.

Mednick, S.C., Nakayama, K., Cantero, J.L., Atienza, M., Levin, A.A., Pathak, N., and Stickgold, R. (2002). The restorative effect of naps on perceptual deterioration. *Nat Neurosci* 5, 677-681.

Miller, E.K., and Cohen, J.D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24, 167-202.

Morimura, N., Yasuda, H., Yamaguchi, K., Katayama, K., Hatayama, M., Tomioka, N.H., Odagawa, M., Kamiya, A., Iwayama, Y., Maekawa, M., *et al.* (2017). Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrfr2/SALM1*-deficient mice. *Nature communications* 8.

Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., and Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learn Memory* 9, 49-57.

- Nadel, L. & Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 217–227.
- Nair, D., Hossy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., and Sibarita, J.B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *Journal of Neuroscience* 33, 13204-13224.
- Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Pallas, D.C., Ceman, S., Bassell, G.J., and Warren, S.T. (2007). FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *Journal of Neuroscience* 27, 14349-14357.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurons. *Nature* 307, 462-465.
- Onda, H., Lueck, A., Marks, P.W., Warren, H.B., and Kwiatkowski, D.J. (1999). Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. *J Clin Invest* 104, 687-695.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13, 22-37.
- Preston, A.R., and Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol* 23, R764-773.
- Reith, R.M., McKenna, J., Wu, H., Hashmi, S.S., Cho, S.H., Dash, P.K., and Gambello, M.J. (2013). Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis* 51, 93-103.
- Rice, C.J., Sandman, C.A., Lenjavi, M.R., and Baram, T.Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology* 149, 4892-4900.
- Rich, E.L., and Shapiro, M.L. (2007). Prelimbic/infralimbic inactivation impairs memory for multiple task switches, but not flexible selection of familiar tasks. *Journal of Neuroscience* 27, 4747-4755.
- Ridler, K., Suckling, J., Higgins, N.J., de Vries, P.J., Stephenson, C.M., Bolton, P.F., and Bullmore, E.T. (2007). Neuroanatomical correlates of memory deficits in tuberous sclerosis complex. *Cereb Cortex* 17, 261-271.

- Robertson, H.A. (1992). Immediate-Early Genes, Neuronal Plasticity, and Memory. *Biochem Cell Biol* 70, 729-737.
- Robinson, J.L., Molina-Porcel, L., Corrada, M.M., Raible, K., Lee, E.B., Lee, V.M.Y., Kawas, C.H., and Trojanowski, J.Q. (2014). Perforant path synaptic loss correlates with cognitive impairment and Alzheimer's disease in the oldest-old. *Brain* 137, 2578-2587.
- Sabatini, D.M., Barrow, R.K., Blackshaw, S., Burnett, P.E., Lai, M.M., Field, M.E., Bahr, B.A., Kirsch, J., Betz, H., and Snyder, S.H. (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284, 1161-1164.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sasaki, T., Leutgeb, S., and Leutgeb, J.K. (2015). Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. *Current Opinion in Neurobiology* 32, 16-23.
- Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., Ikeda, K., and Mizuguchi, M. (2012). Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature communications* 3, 1292.
- Schmidt, M.V., Trumbach, D., Weber, P., Wagner, K., Scharf, S.H., Liebl, C., Datson, N., Namendorf, C., Gerlach, T., Kuhne, C., *et al.* (2010). Individual stress vulnerability is predicted by short-term memory and AMPA receptor subunit ratio in the hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 16949-16958.
- Shi, S.H., Hayashi, Y., Esteban, J.A., and Malinow, R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105, 331-343.
- Smalley, S.L., Tanguay, P.E., Smith, M., and Gutierrez, G. (1992). Autism and Tuberous Sclerosis. *J Autism Dev Disord* 22, 339-355.
- Smrt, R.D., and Zhao, X. (2010). Epigenetic regulation of neuronal dendrite and dendritic spine development. *Front Biol (Beijing)* 5, 304-323.
- Spooren, W., Lindemann, L., Ghosh, A., and Santarelli, L. (2012). Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends Pharmacol Sci* 33, 669-684.

- Squire, L.R., and Alvarez, P. (1995). Retrograde-Amnesia and Memory Consolidation - a Neurobiological Perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5, 169-177.
- Stickgold, R., James, L., and Hobson, J.A. (2000). Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nat Neurosci* 3, 1237-1238.
- Sutherland, G.R., and McNaughton, B. (2000). Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol* 10, 180-186.
- Swerdlow, N.R., Benbow, C.H., Zisook, S., Geyer, M.A., and Braff, D.L. (1993). A Preliminary Assessment of Sensorimotor Gating in Patients with Obsessive-Compulsive Disorder. *Biol Psychiat* 33, 298-301.
- Swerdlow, N.R., Paulsen, J., Braff, D.L., Butters, N., Geyer, M.A., and Swenson, M.R. (1995). Impaired Prepulse Inhibition of Acoustic and Tactile Startle Response in Patients with Huntingtons-Disease. *J Neurol Neurosur Ps* 58, 192-200.
- Tada, T., and Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16, 95-101.
- Takarae, Y., and Sweeney, J. (2017). Neural Hyperexcitability in Autism Spectrum Disorders. *Brain Sci* 7.
- Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Res* 84, 27-33.
- Taliaz, D., Loya, A., Gersner, R., Haramati, S., Chen, A., and Zangen, A. (2011). Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 4475-4483.
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.H., Cotrina, M.L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M.S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., *et al.* (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83, 1131-1143.
- Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Schuman, E.M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 467-472.

- Tavazoie, S.F., Alvarez, V.A., Ridenour, D.A., Kwiatkowski, D.J., and Sabatini, B.L. (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8, 1727-1734.
- Tischmeyer, W., and Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55, 564-574.
- Troca-Marin, J.A., Alves-Sampaio, A., and Montesinos, M.L. (2012). Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. *Prog Neurobiol* 96, 268-282.
- Tucker, L.B., and McCabe, J.T. (2017). Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11.
- Uhlmann, E.J., Wong, M., Baldwin, R.L., Bajenaru, M.L., Onda, H., Kwiatkowski, D.J., Yamada, K., and Gutmann, D.H. (2002). Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. *Ann Neurol* 52, 285-296.
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10, 272-282.
- VarghaKhadem, F. (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory (vol 277, pg 376, 1997). *Science* 277, 1117-1117.
- von der Brellie, C., Waltereit, R., Zhang, L., Beck, H., and Kirschstein, T. (2006). Impaired synaptic plasticity in a rat model of tuberous sclerosis. *Eur J Neurosci* 23, 686-692.
- Wagner, U., Gais, S., Haider, H., Verleger, R., and Born, J. (2004). Sleep inspires insight. *Nature* 427, 352-355.
- Walker, M.P., Brakefield, T., Morgan, A., Hobson, J.A., and Stickgold, R. (2002). Practice with sleep makes perfect: Sleep-dependent motor skill learning. *Neuron* 35, 205-211.
- Waltereit, R., Welzl, H., Dichgans, J., Lipp, H.P., Schmidt, W.J., and Weller, M. (2006). Enhanced episodic-like memory and kindling epilepsy in a rat model of tuberous sclerosis. *J Neurochem* 96, 407-413.
- Wang, X.M., and Proud, C.G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21, 362-369.

- Wang, Y., Greenwood, J.S., Calcagnotto, M.E., Kirsch, H.E., Barbaro, N.M., and Baraban, S.C. (2007). Neocortical hyperexcitability in a human case of tuberous sclerosis complex and mice lacking neuronal expression of TSC1. *Ann Neurol* 61, 139-152.
- Webb, D.W., Fryer, A.E., and Osborne, J.P. (1996). Morbidity associated with tuberous sclerosis: A population study. *Dev Med Child Neurol* 38, 146-155.
- Wilson, M.A. (2002). Hippocampal memory formation, plasticity, and the role of sleep. *Neurobiol Learn Mem* 78, 565-569.
- Witter, M.P. (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163, 43-61.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Zamanillo, D., Sprengel, R., Hvalby, O., Jensen, V., Burnashev, N., Rozov, A., Kaiser, K.M.M., Koster, H.J., Borchardt, T., Worley, P., *et al.* (1999). Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284, 1805-1811.
- Zeng, L.H., Xu, L., Gutmann, D.H., and Wong, M. (2008). Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 63, 444-453.
- Zhang, B., McDaniel, S.S., and Rensing, N.R. (2013). Vigabatrin Inhibits Seizures and mTOR Pathway Activation in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex. *Plos One* 8.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>two-way analysis of variance</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C (Atom)	Kohlenstoff
C (Base)	Cytosin
C (Gehirnregion)	Cortex
CaMKK	<i>calcium calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA; <i>complementary DNA</i>
cm	Centimeter
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
CSS	chronisch-sozialer Stress
Ct-Wert	Schwellenwert- Zyklus; <i>threshold cycle</i>
d	Tage
Da	Dalton
dB	Dezibel
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DG	Dentate gyrus

DI	Diskriminationsindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTPs	Desoxy-Thymidintriphosphat
E	Embryonaltag
EC	Entorhinaler Cortex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPM	<i>elevated plus maze</i>
<i>et al.</i>	und andere; <i>et alterae</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKBP12	<i>FK-binding protein 12</i>
g	Gramm
GABA	GABA-Aminotransferase
gDNA	genomische DNA
h	Stunde; <i>hours</i>
HC	Hippocampus
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Horseradishperoxidase
ID	<i>intellectual disability</i>
IQ	Intelligenzquotient
IA	<i>step-down inhibitory avoidance task</i>
IEGs	<i>immediate early genes</i>
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“, nicht in einem lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	lat. „im Lebendigen“, im lebenden Organismus
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

Kit	Experiment Kit
l	Liter
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Marker
M	Molar
m	milli
MBU	<i>mouse behavior unit</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ	mikro
min	Minute
mEPSC	<i>miniature excitatory postsynaptic current</i>
mGluR	metabotropen Glutamatrezeptoren
mPFC	medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Boten-RNA; <i>messenger ribonucleic acid</i>
ms	Millisekunde
MTT	<i>multi trace theory</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MWM	<i>morris water maze</i>
n	nano
NaOH	Natriumhydroxid
NB	<i>nest building</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NORT	<i>novel object recognition task</i>

OS	Opitz Syndrom
p70S6K	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
P	Postnataltag
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDZ	<i>PSD95-disc large-zonula occludens-1</i>
PFC	Präfrontaler Cortex
PG	Plattform gegenüber
pH	pondus Hydrogenii
PPI	<i>prepulse inhibition</i>
PL	Plattform linksseitig
PR	Plattform rechtsseitig
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PQ	Plattformquadrant
PVDF	Polyvinylindendifluorid
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ribonukleinsäure; <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehung pro Minute; <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SI	<i>social interaction</i>
T _A	Anlagerungstemperatur; <i>annealing temperature</i>
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TARC	<i>translational animal research center</i>
Taq-Pol	Taq-Polymerase; hitzestabiles Enzym aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N,NB,' -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TS	<i>tail suspension</i>
TS	Tuberöse Sklerose
<i>Tsc1</i>	<i>tuberous sclerosis 1</i>
<i>Tsc2</i>	<i>tuberous sclerosis 2</i>
U	Units
Ü.N.	über Nacht
V	Volumen
VTA	<i>area tegmentalis ventralis</i>
wt	Wildtyp
x	mal
YM	<i>Y maze</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Modell der mTOR-Signalkaskade.....	2
Abbildung 1.2: Eine Fehlregulation der mTOR-vermittelten Proteintranslation führt zu Anomalien der dendritischen Fortsätze.....	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der fehlregulierten Proteintranslation bei Tuberöser Sklerose (TS).....	8
Abbildung 1.4: Gedächtniskonsolidierungsmodelle.....	15
Abbildung 1.5: Der EC als „Torwächter“ im cortikalen Gedächtnisnetzwerk.....	17
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der in die Gedächtniskonsolidierung involvierten Gehirnstrukturen.....	18
Abbildung 2.1: <i>Social Interaction</i> (SI).....	43
Abbildung 2.2: Nestbauanalyse zur Charakterisierung des Sozialverhaltens.....	44
Abbildung 2.3: <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM) zur Charakterisierung des Angstverhaltens einer Maus.....	45
Abbildung 2.4: <i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM) zur Quantifizierung kognitiver Defizite.....	47
Abbildung 2.5: <i>Morris Water Maze</i> (MWM).....	48
Abbildung 2.6: <i>24 Hours Novel Object Recognition Task</i> (24 h NORT) zur Analyse kognitiver Fähigkeiten.....	50
Abbildung 2.7: <i>Seven Days Novel Object Recognition Task</i> (7 d NORT) zur Analyse der Gedächtniskonsolidierung.....	54
Abbildung 2.8: Chronisch-sozialer Stress (CSS).....	47
Abbildung 2.9: Exemplarische Genotypisierung nach gelelektrophoretischer Fragmentauftrennung der PCR-Produkte.....	57
Abbildung 3.1: <i>Social Interaction</i> (SI) in einer 2,5-minütigen Testperiode.....	67
Abbildung 3.2: Bewertung des Nestbaus zur Beurteilung des Sozialverhaltens.....	68
Abbildung 3.3: Angstverhalten im <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM) in einer 300-sekündigen Testperiode.....	70
Abbildung 3.4: <i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM) in einer zehnminütigen Testphase.....	71
Abbildung 3.5: <i>Morris Water Maze</i> (MWM) zur Analyse der hippocampalen Gedächtnisfunktion.....	76
Abbildung 3.6: <i>24 Hours Novel Object Recognition Task</i> (24 h NORT) zur Analyse kognitiver Fähigkeiten.....	78

Abbildung 3.7: <i>Seven Days Novel Object Recognition Task</i> (7 d NORT) zur Analyse der Gedächtniskonsolidierung.....	80
Abbildung 3.8: <i>Social Interaction</i> (SI) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 2,5-minütigen Testperiode.....	82
Abbildung 3.9: Nestbaurverhalten nach chronisch-sozialem Stress (CSS).....	83
Abbildung 3.10: Angstverhalten im <i>Elevated Plus Maze</i> (EPM) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 300-sekündigen Testperiode.....	84
Abbildung 3.11: <i>Spontaneous Alternation in Y maze</i> (YM) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer zehnminütigen Testphase.....	86
Abbildung 3.12: <i>Prepulse Inhibition</i> (PPI) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 30-minütigen Testperiode.....	88
Abbildung 3.13: <i>Tail Suspension</i> (TS) nach chronisch-sozialem Stress (CSS) in einer 360-sekündigen Testphase.....	90
Abbildung 3.14: Tsc2-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.....	95
Abbildung 3.15: GluA1- und GluA2-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.....	97
Abbildung 3.16: PSD95-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.....	98
Abbildung 3.17: S6- und pS6-Proteinanalysen im Cortex, PFC und HC mittels Western Blot.....	100
Abbildung 3.18: RT-qPCRs der aktivitätsabhängigen Gene <i>zif268</i> (A) und <i>cFos</i> (B) nach Lernphase (1), <i>24 Hours Novel Object Recognition task</i> (24 h NORT) (2) und <i>Seven Days Novel Object Recognition task</i> (7 d NORT) (3).....	102

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien und ihre Hersteller.....	23
Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung.....	24
Tabelle 2.3: Kits und ihre Hersteller.....	25
Tabelle 2.4: Marker und ihre Hersteller.....	25
Tabelle 2.5: Enzyme und ihre Hersteller.....	26
Tabelle 2.6: Primäre Antikörper und ihre Hersteller.....	26
Tabelle 2.7: Sekundäre Antikörper und ihre Hersteller.....	26
Tabelle 2.8: Primer für Genotypisierungen, ihre Sequenzen und Produktlängen.....	27
Tabelle 2.9: Primer für RT-qPCRs, ihre Sequenzen und Produktlängen.....	27
Tabelle 2.10: Zuchtstrategie der <i>Tsc2^{+/-}</i> -Mauslinie.....	29
Tabelle 2.11: Basisdaten der für Experimente verwendeten Mäuse.....	29
Tabelle 2.12: Basisdaten der verwendeten murinen Gehirne.....	37
Tabelle 2.13: Name, Version und Anwendung der für die Dissertation verwendeten EDV- Programme.....	40
Tabelle 2.14: PCR-Programm für Genotypisierungen von <i>Tsc2^{+/-}</i> -Mäusen.....	57
Tabelle 2.15: Programm der reversen Transkription für die Umschreibung von RNA in cDNA.....	59
Tabelle 2.16: RT-qPCR-Programm.....	61
Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Proteingele.....	63

6.4 Konferenzbeiträge

Autism Tree Project Foundation, 4th Annual Neuroscience Conference, San Diego 2018, teilgenommen

American Society of Human Genetics (ASHG), San Diego 2018, teilgenommen

Specific memory-related cognitive deficits in a mouse model of tuberous sclerosis; A. Arlt, J. Krummeich, K. Radyushkin, J. Winter, S. Rumpel, S. Schweiger; Forum for Neuroscience (FENS), Berlin 2018

Intrafamilial variability of neuropsychiatric symptoms associated with the microduplication of chromosome 16p11.2; A. Arlt, S. Käseberg, M. Linke, J. Winter, O. Bartsch, S. Davydenko, O. Tüscher, S. Schweiger, K. Komlosi; European Society of Human Genetics (ESHG), Mailand 2018

Specific changes in hippocampal-cortical projections underlie intellectual disability in patients with Tuberous Sclerosis; A. Arlt, J. Krummeich, J. Winter, K. Radyushkin, S. Schweiger; Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Münster 2018

Early shift of E/I balance in a heterozygous *Tsc2*KO model leads to a tuberous sclerosis phenotype; A. Arlt, J. Winter, K. Radyushkin, S. Schweiger; Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Bochum 2017

Resilience formation against chronic stress: the *Tsc2*KO mouse model to study the involvement of the mTOR pathway; A. Arlt, J. Winter, K. Radyushkin, S. Schweiger; European Society of Human Genetics (ESHG), Barcelona 2016

Resilience formation against chronic stress: the *Tsc2*KO mouse model to study the involvement of the mTOR pathway; A. Arlt, J. Winter, K. Radyushkin, S. Schweiger; Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Lübeck 2016

German Society of Neurogenetics, Bonn 2015, teilgenommen

6.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Annabelle Arlt (geboren am 08.08.1984 in Siegen), die vorliegende Doktorarbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Der Inhalt der Promotionsordnung ist mir bekannt.