

**mTOR-Dysregulation bei monogenen Syndromen:
Entwicklung von Autismus und Störung der Gedächtniskonsolidierung
in einem Mausmodell für Tuberöse Sklerose**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

angefertigt im Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von Jennifer Krummeich

geboren am

Matrikelnummer:

Mainz, April 2022

1. Berichtersteller:

2. Berichtersteller:

Datum der mündlichen Prüfung: 28.07.2022

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS.....	11
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	12
ZUSAMMENFASSUNG	14
ABSTRACT.....	15
1 EINLEITUNG.....	16
1.1 Das mTOR-Netzwerk	16
1.1.1 mTORC1.....	17
1.1.1.1 Signaltransduktion upstream von mTORC1	18
1.1.1.2 Signaltransduktion downstream von mTORC1	19
1.1.2 mTORC2.....	20
1.1.2.1 Signaltransduktion upstream von mTORC2.....	21
1.1.2.2 Signaltransduktion downstream von mTORC2.....	22
1.1.3 Die Rolle von mTOR im Gehirn.....	23
1.1.4 mTOR Fehlregulation – klinische Bedeutung von mTOR	25
1.1.5 Der Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 (IGF-II)	26
1.1.6 Unmittelbar frühe Gene – <i>immediate early genes</i>	28
1.2 Tuberöse Sklerose	29
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	30
1.2.2 Klinische Manifestationen	30
1.2.2.1 Neurologische Manifestationen	31
1.2.2.1.1 Neurologisch-morphologisch.....	31
1.2.2.1.1 Neurologisch-funktionell	32
1.2.3 Molekulare Grundlagen	33
1.2.3.1 Genetischer Hintergrund.....	33
1.2.3.2 Die Proteine Tuberin und Hamartin – der TSC-Komplex innerhalb des mTOR Signalweges	36
1.2.4 <i>In vivo</i> Modelle	36

1.3	Gedächtnisbildung und -konsolidierung	39
1.3.1	Gedächtnis	39
1.3.2	Gedächtnisbildung	39
1.3.3	Neuronale Plastizität	40
1.3.4	Hippocampus	41
1.4	Autismus	42
1.4.1	Epidemiologie und Klinik.....	42
1.4.2	Genetische und neuroanatomische Ursachen von Autismus-Spektrum-Störungen.....	43
1.4.3	Neurologine und Autismus-Spektrum-Störungen	44
1.5	Forschungsfrage und Zielsetzung.....	46
2	MATERIAL UND METHODEN	48
2.1	Material.....	48
2.1.1	Geräte.....	48
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	49
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	50
2.1.4	Kits.....	52
2.1.5	Primer.....	52
2.1.6	Antikörper.....	53
2.1.7	EDV Programme.....	54
2.1.8	Statistik	54
2.2	Methoden	55
2.2.1	<i>In vivo</i> Experimente mit <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäusen	55
2.2.1.1	<i>Tsc2^{+/-}</i> -KO Mauslinie.....	55
2.2.1.2	Mauszucht.....	56
2.2.1.3	Genotypisierung.....	56
2.2.1.4	Verhaltensexperimente	58
2.2.1.4.1	Soziale Interaktion (SI) – Ein-Kammer-Test	59
2.2.1.4.2	Nestbau (NB)	60
2.2.1.4.3	Körperpflege	60
2.2.1.4.4	Wiedererkennung neuartiger Objekte nach 24 Stunden und nach 7 Tagen (24 h NORT und 7 d NORT).....	61
2.2.1.4.5	Episodische Gedächtnisbatterie	62
2.2.1.5	Stereotaktische Injektion.....	65
2.2.1.5.1	Stereotaktische Injektion von Choleratoxin-B zur Analyse der neuronalen Projektionen – Neuroanatomisches Tracing	67

2.2.1.5.2	Stereotaktische Injektion von IGF-II und Jaspilakinolide.....	72
2.2.1.6	Isolation muriner Gehirne	72
2.2.2	<i>In vitro</i> Experimente	73
2.2.2.1	Molekularbiologische Methoden	73
2.2.2.1.1	Isolation von RNA aus Gewebe	73
2.2.2.1.2	cDNA-Synthese.....	74
2.2.2.1.3	Quantitative Real-Time PCR (qPCR).....	74
2.2.2.1.4	Isolation von Proteinen aus Gewebe	75
2.2.2.1.5	Isolation von Synaptosomen aus Gewebe mittels Sucrosegradient	75
2.2.2.1.6	Isolation von Synaptosomen aus Gewebe mittels Syn-Per™ Reagenz	79
2.2.2.1.7	Fraktionierung des globulären und filamentösen Aktins	79
2.2.2.1.8	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	80
2.2.2.1.9	Western Blot traditionell	82
2.2.2.1.10	Kapillarbasiertes und automatisiertes Western Blotting	83
2.2.2.1.11	Proteomik	84
2.2.2.1.11.1	Core Facility Innsbruck.....	84
2.2.2.1.11.2	Core Facility für Massenspektrometrie und Quantitative Proteomanalytik in Mainz.....	85
3	ERGEBNISSE.....	86
3.1	Phänotypische Längsschnittanalyse eines heterozygoten Mausmodells für Tuberöse Sklerose	86
3.1.1	Entwicklung Autismus-ähnlicher Verhaltensmuster ab einem Alter von 2 Monaten	87
3.1.1.1	Körperpflege	87
3.1.2	Störung des Sozialverhaltens ab einem Alter von 3-4 Monaten.....	89
3.1.2.1	Ein-Kammer-Test für soziale Interaktion	89
3.1.2.2	Nestbau	90
3.1.3	Kognitive Defizite ab einem Alter von 8-10 Monaten	92
3.1.3.1	Wiedererkennung neuartiger Objekte nach 7 Tagen	92
3.1.3.2	Episodische Gedächtnisbatterie	93
3.2	Entstehung der Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten in jungen <i>Tsc2</i>^{+/-} Mäusen und Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen .	96
3.2.1	Proteinexpression von Tsc2 in kortikalem Gewebe im Zeitverlauf	96
3.2.2	Proteinexpression der mTOR-Zielgene phospho-S6 und phospho-Akt im Zeitverlauf.....	97

3.2.3	Molekulare Dynamik synaptischer Rezeptoren im sich entwickelnden Maushirn	98
3.2.4	Dysregulation synaptischer- und Autismus-assoziiertes Proteine in der Zeitspanne der Phänotyp-Entwicklung	103
3.2.5	Dysregulation des Neuroligin/Neurexin-Systems in heterozygoten <i>Tsc2</i> -Mäusen im Zeitverlauf	106
3.3	Entstehung der kognitiven Defizite in alternden <i>Tsc2</i>^{+/-} Mäusen und Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.....	109
3.3.1	Neuroanatomisches Tracing zur Untersuchung möglicher Projektionsdefizite in alternden <i>Tsc2</i> ^{+/-} Mäusen	109
3.3.1.1	Vorangegangene Studie zur Expression unmittelbar früher Gene in alternden <i>Tsc2</i> ^{+/-} Mäusen	109
3.3.1.2	Neuroanatomisches Tracing	110
3.3.1.2.1	Intakte Hippocampusanatomie	111
3.3.1.2.2	Intakte Projektionen innerhalb des Tractus perforans	112
3.3.2	Proteom-Analyse in alternden <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mäusen	115
3.3.3	<i>In vivo</i> Behandlung zur Wiederherstellung der kognitiven Funktionen	121
3.3.3.1	Einfluss von IGF-II auf die Gedächtniskonsolidierung alternder <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Tiere	121
3.3.3.2	Einfluss von IGF-II auf die Expression der unmittelbar frühen Gens <i>c-fos</i> und <i>zif268</i> in alternden <i>Tsc2</i> ^{+/-} Mäusen	123
4	DISKUSSION.....	125
4.1	Phänotypische Längsschnittanalyse des heterozygoten <i>Tsc2</i>-Mausmodells	125
4.2	Dysregulation synaptischer und Autismus-assoziiertes Proteine als molekulare Grundlage der Autismus-ähnlichen Verhaltensauffälligkeiten in <i>Tsc2</i>^{+/-}-Tieren.....	128
4.2.1	Phänotypische Auffälligkeiten entwickeln sich unabhängig vom primären Gendefekt	128
4.2.2	Dysregulation synaptischer Rezeptorproteine in frühen postnatalen Stadien der Gehirnentwicklung	131
4.2.3	Dysregulation des Neuroligin/ Neurexin-Systems während der Entwicklung des autistischen Phänotyps.....	135
4.3	Molekulare Grundlagen der Konsolidierungsdefekte in heterozygoten <i>Tsc2</i>-Mäusen.....	137

4.3.1	Kein Hinweis auf Projektionsdefizite oder Neurodegeneration im Hippocampus alternder <i>Tsc2^{+/-}</i> -Mäuse	137
4.3.2	Proteomische Analysen in Hippocampi alternder <i>Tsc2^{+/-}</i> -Tiere	139
4.3.3	IGF-II gleicht den Konsolidierungsdefekt in alternden <i>Tsc2^{+/-}</i> -Mäusen aus	141
4.3.4	IGF-II normalisiert die mRNA-Expression des unmittelbar frühen Gens <i>c-fos</i> im Hippocampus von alternden <i>Tsc2^{+/-}</i> -Mäusen	143
4.4	Fazit	146
LITERATURVERZEICHNIS		147
DANKSAGUNG		179
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		182

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Komponenten von mTORC1.....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Regulatoren upstream von mTORC1.....	18
Abbildung 3: Effektoren downstream von mTORC1 und deren zelluläre Auswirkungen.	20
Abbildung 4: Komponenten von mTORC2.....	21
Abbildung 5: Effektoren downstream von mTORC2 und deren Funktionen.....	23
Abbildung 6: Rolle von mTORC1 und mTORC2 im Gehirn.....	25
Abbildung 7: Klinische Manifestationen der Multisystemerkrankung Tuberöse Sklerose.	31
Abbildung 8: Koronarschnitt durch die Hippocampusformation.	42
Abbildung 9: Primer-Strategie zur <i>Tsc2</i> Genotypisierung (Onda et al. 1999)	57
Abbildung 10: Exemplarische Genotypisierung nach gelelektrophoretischer Auftrennung	58
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ein-Kammer-Tests für soziale Interaktion.	59
Abbildung 12: Analyse des Nestbau Verhaltens	60
Abbildung 13: Sequentielles Putzmuster	61
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Tests zur Wiedererkennung neuartiger Objekte	62
Abbildung 15: Schematische Darstellung des NOR Tests	63
Abbildung 16: Schematische Darstellung des OPR Tests	63
Abbildung 17: Schematische Darstellung des OCR Tests.....	64
Abbildung 18: Schematische Darstellung des OPCR Tests	65
Abbildung 19: Bildliche Darstellung eines KOPF-Stereotakten	66
Abbildung 20: Lokation von Bregma und Lambda	66
Abbildung 21: Schematische Darstellung der drei Ebenen im stereotaktischen Apparat	66
Abbildung 22: Schematische Darstellung des retrograden Transports der drei verschiedenen Cholera-Toxinkonjugate	68
Abbildung 23: Visualisierung der drei verschiedenen CT-B Injektionsstellen	69
Abbildung 24: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des dorsalen Hippocampus	70
Abbildung 25: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des ventralen Hippocampus.....	71
Abbildung 26: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des entorhinalen Cortex	71

Abbildung 27: Test zur Wiedererkennung neuartiger Objekte mit zusätzlicher IGF-II- oder JPK- Injektion an Tag 2.	72
Abbildung 28: Workflow für die Isolation von Synaptosomen aus hippocampalen Homogenaten.	77
Abbildung 29: Separation der Membranfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation	78
Abbildung 30: Schematischer Aufbau der Western Blot Kammer.....	82
Abbildung 31: Erhöhtes repetitives Fellpflege-Verhalten in <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäusen ab einem Alter von 2 Monaten	89
Abbildung 32: Verminderte soziale Interaktion bei <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäusen ab einem Alter von 3-4 Monaten.	90
Abbildung 33: Gestörtes Nestbau-Verhalten bei <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäusen ab einem Alter von 3-4 Monaten.	91
Abbildung 34: Kognitive Einschränkungen in der Wiedererkennung neuartiger Objekte der <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäuse im Alter von 8-10 Monaten.	93
Abbildung 35: Kognitive Einschränkungen des episodischen Gedächtnisses der <i>Tsc2^{+/-}</i> Mäuse im Alter von 8-10 Monaten.	94
Abbildung 36: Zusammenfassung der phänotypischen Längsschnittanalyse des heterozygoten Mausmodells für Tuberöse Sklerose.	95
Abbildung 37: Entwicklungsverlauf der Tsc2-Proteinexpression.	97
Abbildung 38: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression des phosphorylierten S6-Proteins sowie des phosphorylierten Akt-Proteins, jeweils im Verhältnis zum nicht-phosphorylierten Protein, in kortikalen Homogenaten.	98
Abbildung 39: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression des NMDA Rezeptors GluN2A in Homogenaten und Synaptosomen.....	100
Abbildung 40: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression der AMPA Rezeptoren GluA1 und GluA2 in Homogenaten und Synaptosomen.....	101
Abbildung 41: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression der GABA-Rezeptoren GABAA α 1, GABABR1 und GABABR2 in Homogenaten und Synaptosomen.	102
Abbildung 42: Kreisdiagramm zur Visualisierung differentiell exprimierter synaptischer Proteine zum Zeitpunkt P28 und 3m.....	104
Abbildung 43: Proteomanalyse kortikaler Synaptosomen zu den Zeitpunkten P28 und 3 Monate.	105
Abbildung 44: Relative Proteinexpressionsniveaus von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 zum Zeitpunkt P28 und 3m in kortikalen Fraktionen.	108
Abbildung 45: Relative Proteinexpressionsniveaus von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 zum Zeitpunkt P28 in hippocampalen Fraktionen.	108
Abbildung 46: Analyse der Hippocampusanatomie.	111

Abbildung 47: Elektronenmikroskopische Validierung der Injektionsstellen hinsichtlich Lokalität und Intensität.	113
Abbildung 48: Schematische Darstellung der Hirnregionen, in denen projizierende Neurone detektiert werden konnten.	114
Abbildung 49: Identifikation positiver Projektionen am Beispiel des kontralateralen ventralen Hippocampus.....	114
Abbildung 50: Anzahl der projizierenden Zellen in der jeweiligen Hirnregion.....	115
Abbildung 51: Teilnetz des Tsc2-Interaktoms, welches die Herunterregulierung von synaptischen Membran- und Zytoskelett-assoziierten Proteinen darstellt.....	117
Abbildung 52: Relative Proteinexpressionsniveaus ausgewählter Proteine zum Zeitpunkt von 8 Monaten in hippocampalen Fraktionen.	118
Abbildung 53: Beispielhafte Darstellung der einzelnen Peaks für G- und F-Aktin nach kapillarbasierter Western-Blot Methode.....	119
Abbildung 54: Relative Proteinexpression von F-Aktin zu G-Aktin zum Zeitpunkt von 8 Monaten im Hippocampus.	120
Abbildung 55: Keine Wiederherstellung der kognitiven Funktionen nach JPK-Injektion in 8-10 Monate alten <i>Tsc2</i> ^{+/-} Mäusen.....	121
Abbildung 56: Wiederherstellung der kognitiven Funktionen nach IGF-II-Injektion in 8-10 Monate alten <i>Tsc2</i> ^{+/-} Mäusen.	122
Abbildung 57: Relative mRNA-Expressionsniveaus von <i>c-fos</i> und <i>zif268</i> im Hippocampus alternder <i>Tsc2</i> ^{+/-} - Mäuse sowie wildtypischer Geschwistertiere nach IGF-II- vs. PBS-Behandlung.	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Eigenschaften von <i>Tsc1</i> und <i>Tsc2</i>	35
Tabelle 2: Verwendete Geräte und ihre Hersteller	48
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien/ Reagenzien und ihre Hersteller	49
Tabelle 4: Verwendete Puffer/ Lösungen und ihre Zusammensetzung	50
Tabelle 5: Verwendete Kits und ihre Hersteller	52
Tabelle 6: Verwendete Primersequenzen	52
Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper, deren Hersteller und Bestellnummer	53
Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper, deren Hersteller und Bestellnummer	53
Tabelle 9: Verwendete EDV-Programme und ihre Entwickler	54
Tabelle 10: Kreuzungsschema 1 der <i>Tsc2</i> ^{+/-} -Mauslinie	56
Tabelle 11: Zusammensetzung des Verdauungspuffers zur Genotypisierung.	56
Tabelle 12: Mastermix für Genotypisierungs-PCR	57
Tabelle 13: Thermocyclerprogramm „ <i>Tsc2</i> -Genotyping“ für Genotypisierungs-PCR ..	58
Tabelle 14: Liste der verwendeten Molecular Probes® Cholera-Toxin-Konjugate	68
Tabelle 15: Stereotaktische Koordinaten der Injektionsstellen des dorsalen/ ventralen Hippocampus und des entorhinalen Cortex.	70
Tabelle 16: Thermocyclerprogramm für die qPCR	75
Tabelle 17: Zusammensetzung des Protein-Lyse-Puffers <i>MagicMix</i>	75
Tabelle 18: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Fraktionierung von Synaptosomen.	76
Tabelle 19: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Fraktionierung von Aktin.....	80
Tabelle 20: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der SDS-Page.	81
Tabelle 21: Zusammensetzung der verwendeten Gele bei der SDS-Page.....	81
Tabelle 22: Zusammensetzung der verwendeten Puffer beim Western Blot.....	82
Tabelle 23: Verwendete primäre Antikörper beim Western Blot.....	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP	eIF4E Binding Protein
A	Ampere
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Autismus-Spektrum-Störung
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factors
bp	Basenpaare (DNA)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Cortexplatte
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
etc.	et cetera
FKBP12	<i>FK506 binding protein 12</i>
FXS	Fragile X-Syndrom
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HEAT	<i>Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR</i>
IEG	immediate early gene
IGF-1/ IGF-I	insulin-like growth factor 1
IGF-2/ IGF-II	insulin-like growth factor 2

kDa	Kilodalton
LTP	Langzeitpotenzierung
LTD	Langzeitdepression
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	mechanistic target of rapamycin complex 2
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphoinositide 3-kinases
PIKK	PI3K-verwandten Protein Kinasen
PKC	protein kinase c
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S6K1	p70S6 Kinase 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
sog.	sogenannt
SREBP	sterol responsive element binding protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
TS	Tuberöse Sklerose
V	Volt

Zusammenfassung

Eine Dysregulation des mTOR-Signalweges gilt als die Hauptursache für verschiedene neurologische Störungen, wie beispielsweise Autismus-Spektrum-Störung oder Intelligenzminderung. Jedoch sind die Folgen von mTOR-Funktionsstörungen auf molekularer und zellulärer Ebene kaum bekannt und können aufgrund seiner Schlüsselfunktion innerhalb verschiedenster metabolischer und neurologischer Prozesse sehr vielfältig sein. Mutationen in einzelnen Genen – so genannte monogene Erkrankungen – können zu syndromalen Formen von Autismus und Intelligenzminderung führen. Je nach dem betroffenen Gen und der individuellen Kompensationsfähigkeit ist die klinische Variabilität meist hoch und nicht alle Patienten zeigen das volle Spektrum der Symptome. Die Tuberöse Sklerose (TS) ist eine Multisystemerkrankung, die durch gutartige Tumore und fokale Dysplasie in mehreren Organen, wie beispielweise Haut und Gehirn, gekennzeichnet ist. Sie geht weiterhin mit einer Funktionsstörung des Gehirns einher, welche Intelligenzminderung und Autismus einschließt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konventionelles Mausmodell für TS verwendet, um die molekularen Mechanismen einer mTOR Dysregulation longitudinal über einen längeren Zeitraum und deren Bedeutung für die Entstehung von ASS und Intelligenzminderung zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass das Tsc2 Protein nur in sehr frühen Stadien, embryonal und postnatal, reduziert vorliegt und zu späteren Zeitpunkten, wenn Verhaltensauffälligkeiten auftreten, kompensiert zu sein scheint, woraus wir schließen, dass sich der Phänotyp unabhängig vom primären Gendefekt entwickelt. Darüber hinaus konnten wir als Ursache für die Entwicklung autistischer Verhaltensauffälligkeiten – welche zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat auftreten – eine substanzielle homöostatische Dynamik der Expression synaptischer Rezeptormoleküle in sehr frühen postnatalen Stadien identifizieren, welche als maladaptive Konsequenz in einem Fenster der Neuroligin-/Neurexin-Fehlexpression in kortikalem Gewebe zum Zeitpunkt der Verhaltensauffälligkeiten resultiert. Hinsichtlich der Entstehung der kognitiven Defizite konnten sowohl zelldegenerative Prozesse als auch Projektionsdefizite ausgeschlossen werden. Zusätzlich dazu konnte der Verdacht auf einen Aktin-Polymerisationsdefekt als zugrundeliegende Ursache nicht bestätigt werden. Vielmehr werden auch hier die Konsequenzen der frühen homöostatischen und womöglich auch über die gesamte Lebensspanne hinweg bestehenden Fehlregulation als ursächlich vermutet. Eine Behandlung mit dem Gedächtnis-verbessernden Wachstumsfaktor IGF-II konnte sowohl den kognitiven Phänotypen in alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verbessern als auch die Trainings-induzierte Reduktion des unmittelbar frühen Gens *c-fos* im Hippocampus wieder normalisieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen neue Möglichkeiten zur Therapie von TS während früher vulnerabler Entwicklungsfenster und womöglich auch von anderen, mit ähnlichen Symptomen assoziierten monogenen Erkrankungen.

Abstract

Dysregulation of the mTOR signaling pathway is considered to be the main cause of various neurological disorders, such as autism spectrum disorder or intellectual disability. However, the consequences of mTOR dysfunction at the molecular and cellular level are poorly understood and can be very diverse due to its key function within a wide variety of metabolic and neurological processes. Mutations in single genes – so-called monogenic disorders – can lead to syndromic forms of autism and intellectual disability. Depending on the affected gene and the individual ability to compensate, clinical variability is usually high and not all patients show the full spectrum of symptoms. Tuberous sclerosis (TS) is a multisystem disease characterized by benign tumors and focal dysplasia in multiple organs, such as skin and brain. It is further associated with brain dysfunction, including autism and intellectual disability. In a conventional heterozygous *Tsc2* knock-out mouse model we have longitudinally analyzed behavior at different time points after birth and have matched this with molecular signatures throughout brain development, to carefully characterize the cascade of cellular processes leading into a disease phenotype. We show that Tsc2 protein is reduced only at very early stages and is fully compensated at later time points when behavior aberrations occur suggesting that the behavior phenotype develops independent of the primary defect. Furthermore, we observed substantial dynamic dysregulation of synaptic receptors at very early postnatal stages, resulting, as a mal-adaptive consequence, in a window of neuroligin/neurexin misexpression in cortical tissue when behavioral deviations were initiated. This suggests that the Neuroligin/Neurexin system plays a critical role in the formation of autistic-like features in *Tsc2*^{+/-} - animals. While elucidating the mechanisms behind the drop in memory consolidation in senile *Tsc2*^{+/-} - animals, we were able to exclude both cell degenerative processes and projection deficits. In addition, the suspicion of an actin polymerization defect as the underlying cause could not be confirmed. Treatment with the memory-enhancing growth factor IGF-II was able to both improve the cognitive phenotype in senile *Tsc2*^{+/-}-mice and normalize the expression of the training-induced immediate early gene *c-fos* in the hippocampus. The results of this work open up new possibilities for the treatment of TS during early vulnerable developmental windows and possibly other monogenic disorders associated with similar symptoms.

1 Einleitung

1.1 Das mTOR-Netzwerk

Das Netzwerk um das „*mechanistic target of rapamycin*“ (mTOR) ist eine der bedeutendsten Regulationseinheiten in jeder Zelle. Hier werden Signale bezüglich Wachstumsbedingungen, verfügbarer Nährstoffe, Sauerstoffgehalt der Umgebung und der Zellhomöostase verarbeitet und die entsprechend notwendigen Prozesse zur Regulation eingeleitet. Das mTOR-Netzwerk fungiert somit als zentrales Element in der Regulation von Zellproliferation und -motilität, Stoffwechsel sowie Proteintranslation und ist im Falle einer Fehlregulation ursächlich für pathologische Prozesse wie Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, Diabetes und Übergewicht. Eukaryotische TOR Kinasen sind ca. 280 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinasen, welche der Gruppe der *Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) -verwandten Protein Kinasen (PIKK)* zugeordnet werden. Als Teil der Signaltransduktion kann die mTOR Kinase Phosphatgruppen an Proteine hinzufügen und diese dadurch aktivieren bzw. regulieren.

Das mTOR-Protein enthält mehrere strukturelle und funktionelle Domänen. In der aminoterminalen Hälfte finden sich eine Reihe von sogenannten *Huntington, Elongation Factor 3, PP2A, TOR1 (HEAT) -Repeats*, welche der Proteininteraktion dienen. Bei diesen Repeats handelt es sich um periodische DNA-Sequenzwiederholungen, welche dreidimensionale, superhelikale Strukturen bilden und dadurch die Proteininteraktion und intrazellulären Transport gewährleisten können (Andrade & Bork, 1995). Bei der *FKBP-rapamycin-binding (FRB)*-Domäne in der Mitte des Proteins handelt es sich um die Bindedomäne für den *FK506 binding protein 12 (FKBP12) -Rapamycin-Komplex*, der die mTOR-Aktivität inhibiert (Brown et al., 1994). Die katalytische Einheit der mTOR Kinase befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins.

1991 gelang Heitmann et al. die Identifizierung des Rapamycin-Zielproteins in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bei Rapamycin handelt es sich um ein Makrolid der Actinobakterien *Streptomyces hygroscopicus*, welche bereits in den 1970er Jahren erstmals charakterisiert wurde. Untersuchungen zeigten, dass Mutationen in den Proteinen TOR1-1 und TOR2-1 zu einer Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von Rapamycin führten (Heitman et al., 1991). 1994 identifizierten Sabatini et al. das Rapamycin-Zielprotein erstmals in Säugetierzellen, genannt mTOR („*mammalian target of Rapamycin*“) (Sabatini et al., 1994). Der nächste große Durchbruch auf dem Gebiet der TOR-Forschung bestand in der Entdeckung von TOR als Multi-Protein-Komplex, welcher aus den beiden Einheiten *TOR-Komplex 1 (mTORC1)* und *TOR-Komplex 2 (mTORC2)* gebildet wird (Jacinto et al., 2004; Loewith et al., 2002). Diese Komplexe zeichnen sich durch ihre einzigartige Struktur und Funktion sowie ihre unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Rapamycin aus. Kennzeichnend für

mTORC1 ist das Schlüsselprotein „*Regulatory-Associated Protein of mTOR*“ (Raptor), während die Hauptkomponente von mTORC2 das Protein „*Rapamycin-insensitive Companion of mTOR*“ (Rictor) bildet. Während mTORC1 vor allem Proliferation, Proteinsynthese und intrazelluläre Recyclingprozesse auf Rapamycin-sensitive Weise reguliert, ist der Rapamycin-insensitive mTORC2 Komplex vorrangig für die Organisation des Zellskeletts sowie die Regulation der Energiehomöostase verantwortlich. Die beiden Komplexe werden in den nachfolgenden Kapiteln näher beleuchtet.

1.1.1 mTORC1

Der Rapamycin-sensitive mTORC1 ist der am ausführlichsten charakterisierte TOR-Komplex. Er wird durch verschiedene intra- und extrazelluläre Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Aminosäuren, Stress, Energiestatus, sowie Sauerstoffkonzentration induziert und koordiniert dadurch viele wichtige Prozesse wie die Protein- und Lipidsynthese, Ribosomenbiogenese und Autophagozytose (Fingar & Blenis, 2004; Noda & Ohsumi, 1998; Zoncu et al., 2011), wodurch Zellwachstum- und proliferation gesteuert werden.

mTORC1 besteht aus fünf Komponenten (siehe Abb. 1): mTOR als katalytische Untereinheit des Komplexes, *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), *mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein* (mLST8), dem insulinregulierten Inhibitor *proline-rich protein 40 kDa* (PRAS40), und dem endogenen mTORC1 Inhibitor *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor).

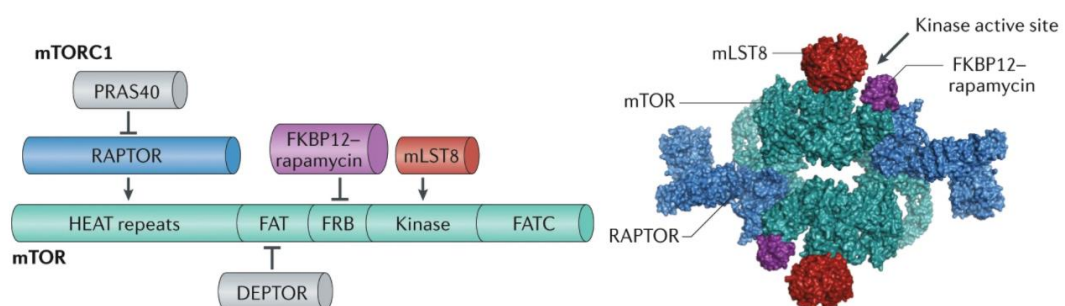


Abbildung 1: Komponenten von mTORC1. Die Domänenstruktur der mTOR-Kinase (grün) ist mit Bindungsstellen für die anderen mTORC1-Untereinheiten annotiert. Der N-Terminus von mTOR enthält Cluster von Huntingtin, Elongationsfaktor 3, einer Untereinheit der Proteinphosphatase 2A und TOR1 (insgesamt als HEAT bezeichnete) -Repeats, gefolgt von einer FRAP-, ATM- und TRRAP (FAT) -Domäne; die FKBP12-Rapamycin-Bindungsdomäne (FRB); die katalytische Kinasedomäne und die C-terminale FATC-Domäne. mTOR bindet mLST8 und DEPTOR. Raptor, die definierende Untereinheit von mTORC1, bindet mTOR mit seinen eigenen HEAT-Repeats und ist für die lysosomale Lokalisierung des Komplexes erforderlich. Raptor rekrutiert zusätzlich PRAS40, einen insulinregulierten Inhibitor der mTORC1-Aktivität (G. Y. Liu & Sabatini, 2020).

1.1.1.1 Signaltransduktion upstream von mTORC1

Zu den mTORC1 regulierenden extrazellulären Faktoren zählen beispielsweise Wachstumsfaktoren wie der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder *insulin-like growth factor 1* (IGF1), Hormone wie beispielsweise Insulin, neurotrophe Faktoren wie der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) sowie auch Neurotransmitter, wie beispielsweise Glutamat (Lenz & Avruch, 2005; Nie et al., 2010).

Wachstumsfaktoren stimulieren mTORC1 hauptsächlich durch die Aktivierung der kanonischen Insulin- und Ras-Signalwege, unter anderem durch die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -AKT-Signalwegs. Wachstumsfaktoren binden hierbei an Rezeptor-Tyrosinkinasen und bewirken so eine Dimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung der Rezeptoren. An diese phosphorylierten Stellen des Rezeptors können dann weitere Moleküle binden und ebenfalls phosphoryliert werden. Auf diese Weise wird PI3K aktiviert. Zusätzlich ist eine Aktivierung der PI3K auch durch das G-Protein Ras möglich. Die Stimulation dieser Signalwege über eine Aktivierung der *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) sowie der *Proteinkinase B* (AKT) führt zu einer Inaktivierung des Tuberosen Sklerose Komplex (TSC) und damit zur Aktivierung von mTORC1.

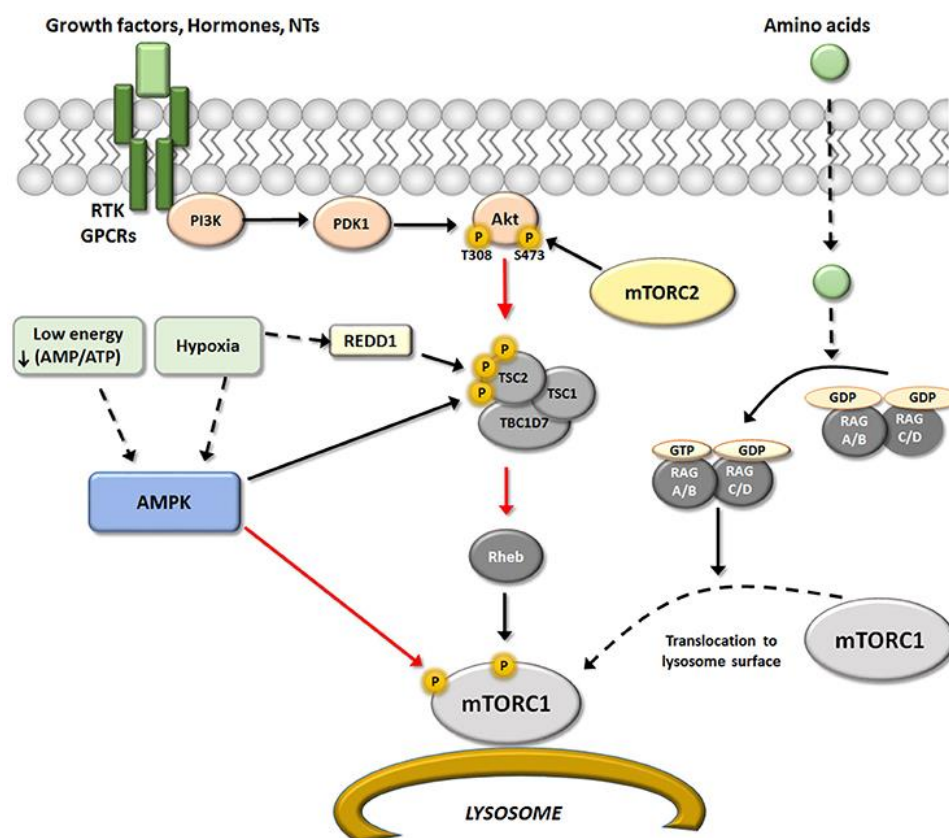


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Regulatoren upstream von mTORC1. Der kanonische Weg reguliert die mTORC1-Aktivität durch Rezeptor-Thyrosin-Kinase-Rezeptoren durch

Modulation von PI3K / PDK1 / Akt / TSC / Reb. Dieser Weg kann durch Wachstumsfaktoren, Hormone und spezifische Neurotransmitter positiv sowie durch AMPK negativ reguliert werden. AMPK wird in Situationen mit niedriger Energie und / oder Hypoxie aktiviert, was zu einer Hemmung der mTORC1-Aktivität führt. Zusätzlich können Aminosäurespiegel die mTORC1-Aktivität direkt an der Lysosomenoberfläche (ein wichtiger Ort für die Aktivierung von mTORC1) durch Modulation der Heterodimere Rag A-D modulieren. Schwarze Pfeile stehen für Aktivierung und rote Pfeile für Hemmung (Perez-Alvarez et al., 2018).

1.1.1.2 Signaltransduktion downstream von mTORC1

Die Proteinsynthese ist der energie- und ressourcenintensivste Prozess in wachsenden Zellen (Buttgereit & Brand, 1995). Er wird daher streng durch mTORC1 kontrolliert, indem dieser durch Phosphorylierung die Expression der beiden Schlüsseleffektoren *p70S6 Kinase 1* (S6K1) und *eIF4E Binding Protein* (4EBP) steuert. Beide assoziieren mit mRNAs und regulieren hierdurch die Initiierung und das Prozessieren der mRNA-Translation, was sie zu direkten Regulatoren der Proteinsynthese macht (Brown et al., 1995; K. Hara et al., 1997; von Manteuffel et al., 1996). Das Gerüstprotein 4EBP blockiert die Translations-Initiation, indem es den *eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E* (eIF4E) bindet, ein wesentlicher Bestandteil des eIF4F-Cap-Bindungskomplexes (Holz et al., 2005). mTORC1 phosphoryliert 4EBP an verschiedenen Stellen, wodurch dessen Dissoziation von eIF4E ausgelöst wird und dadurch die 5'-cap-abhängige mRNA-Translation ermöglicht werden kann (Gingras et al., 1999).

Die S6K1 ist hingegen ein positiver Regulator der Translation. Ihre Aktivität wird durch eine Vielzahl von Phosphorylierungen bestimmt, wobei die Phosphorylierung von Threonin229 im katalytischen Bereich und Threonin389 in der Linker-Domäne die wichtigsten Stellen für die Kinase Funktion darstellen. Die S6K1 wiederum phosphoryliert und aktiviert Initiierungs- und Elongationsfaktoren, wie unter anderem das ribosomale Protein S6. Dieses wird an seiner 40S Untereinheit phosphoryliert, was wiederum die Proteinsynthese am Ribosom induziert und die Ribosomenbiogenese koordiniert, um eine effiziente Translation zu gewährleisten (Ma & Blenis, 2009). Zusätzlich dazu induziert sie die transkriptionelle Aktivität der *rRNA Polymerase I* (RNA Pol1) (Hannan et al., 2003; Mayer et al., 2004). Neben der Regulation der Proteinsynthese beeinflusst mTORC1 auch die Lipidsynthese, den Glucosestoffwechsel sowie die Autophagie.

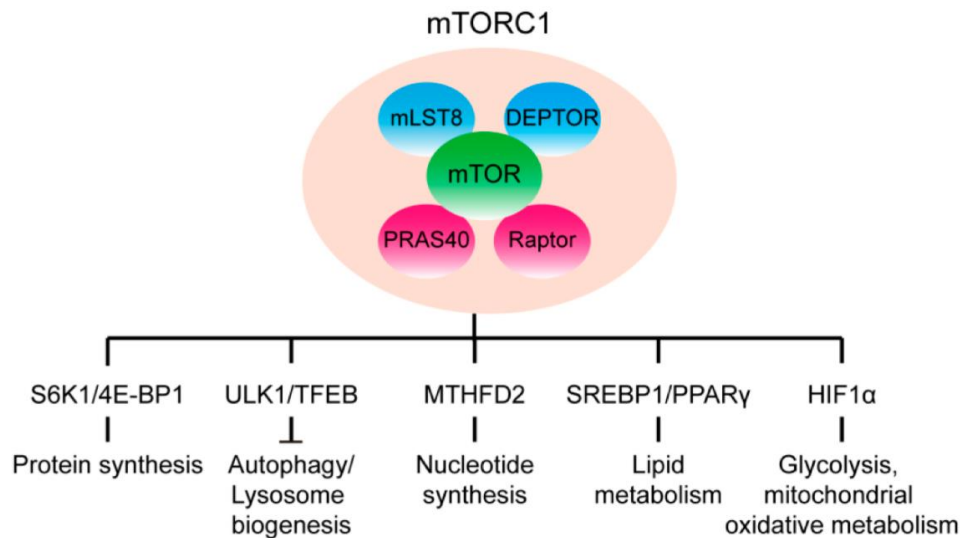


Abbildung 3: Effektoren downstream von mTORC1 und deren zelluläre Auswirkungen. Die Aktivierung von mTORC1 fördert die Proteinsynthese durch S6K1 und 4E-BP1, die Nucleotidsynthese durch die Methylentetrahydrofolate Dehydrogenase 2 (MTHFD2), die Lipogenese durch SREBP1 und PPAR sowie die Glykolyse durch HIF1 α und hemmt die Autophagie und Lysosomenbiogenese durch ULK1 und TFEB (Mao & Zhang, 2018).

1.1.2 mTORC2

Entgegen den vielen bekannten und gut untersuchten Faktoren, die mTORC1 beeinflussen, ist bislang nur wenig über die Aktivatoren und Inhibitoren von mTORC2 bekannt. Die frühe Letalität, die durch die Deletion von mTORC2 Komponenten in Mäusen verursacht wird, sowie das Fehlen von mTORC2 Inhibitoren haben die Erforschung dieses Proteinkomplexes immens erschwert. Dennoch konnten in den letzten Jahren unter der Verwendung unterschiedlicher genetischer Ansätze einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, welche mTORC2 eine Schlüsselrolle in verschiedensten biologischen Prozessen zukommen lassen. Dazu zählt die Organisation des Zytoskeletts, das Überleben der Zellen, Metabolismus und Proliferation.

mTOR bildet auch bei diesem Komplex die katalytische Untereinheit. Anstelle von Raptor enthält mTORC2 jedoch den *rapamycin insensitive companion of mTOR* (Rictor), ein nicht verwandtes Protein, das wahrscheinlich eine analoge Funktion erfüllt (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). mTORC2 enthält außerdem Deptor (Peterson et al., 2009), die regulatorische Untereinheit *mammalian stress activated Map kinase-interacting protein 1* (mSin1) (Frias et al., 2006a) und das *protein associated with rictor 1 or 2* (Protor 1 / 2) (Pearce et al., 2007) (siehe Abb. 4).

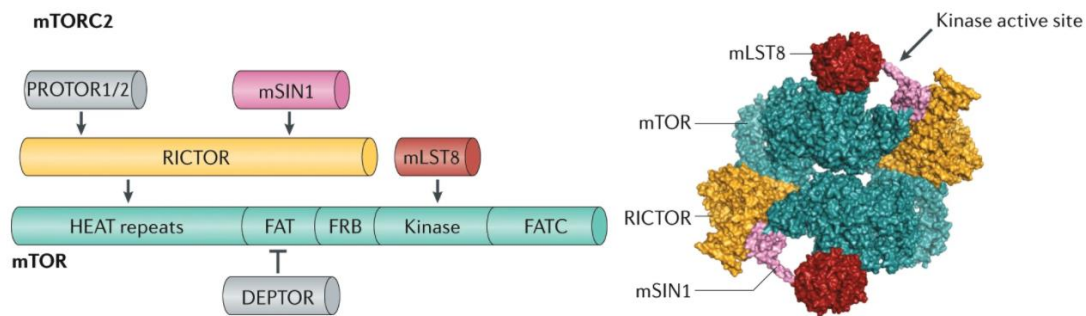


Abbildung 4: Komponenten von mTORC2. Die mTOR-Kinase (grün) ist mit den Bindungsstellen für die anderen Untereinheiten von mTORC2 annotiert. Diese Untereinheiten umfassen mLST8, DEPTOR und RICTOR, die definierende Komponente von mTORC2. Als Gerüstprotein rekrutiert RICTOR das *protein associated with rictor 1 or 2* (PROTOR1 / 2) zusammen mit mSIN1 zu dem Komplex (G. Y. Liu & Sabatini, 2020).

1.1.2.1 Signaltransduktion upstream von mTORC2

Bisher konnte gezeigt werden, dass sich Insulin, Wachstumsfaktoren und die Verfügbarkeit von Nährstoffen auf die Aktivität des Komplexes auswirken können (Frias et al., 2006a; Sarbassov et al., 2005). mTORC2 scheint dabei differenziert auf verschiedene Stimuli zu reagieren, da zwar sowohl AKT, die *Proteinkinase C* (PKC) sowie auch die *Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase* (SGK) von mTORC2 reguliert werden, jedoch auf die Stimulation durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren reagieren. Diese spezifische Signalweitergabe wird möglicherweise durch verschiedene Isoformen oder Splicevarianten von mTORC2-Komponenten erreicht, da Studien zeigten, dass von den fünf Splicevarianten des mTORC2 Gerüstproteins mSin1 nur drei in mTORC2 eingebaut werden, und nur zwei davon durch Insulin stimuliert werden (Frias et al., 2006b).

Der einzig bislang eindeutig charakterisierte endogene Inhibitor von mTORC2 ist das *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor), welches als Teil des Komplexes sowohl bei mTORC1 als auch bei mTORC2 als negativer Regulator fungiert und der bei Nährstoffmangel verstärkt exprimiert wird (Peterson et al., 2009). Obwohl mTORC2 durch eine erhöhte Expression von Deptor negativ reguliert wird, führt dies nicht zwangsläufig zu einer Inhibition von AKT; es kann sogar eine Verstärkung der AKT-Phosphorylierung an den Positionen Serin473 und Threonin308 nachgewiesen werden (Peterson et al., 2009), wofür ein Rückkopplungsmechanismus zu mTORC1 ursächlich sein könnte.

mTORC2 ist im Gegensatz zu mTORC1 hauptsächlich ein Effektor des PI3K-Signalwegs. Die mTORC2-Untereinheit mSin1 enthält eine Phosphoinositid-bindende PH-Domäne, die für die insulinabhängige Regulation der mTORC2-Aktivität

entscheidend ist. Unerwarteterweise wird die mTORC2-Signalisierung auch durch mTORC1 reguliert. Dies ist auf das Vorhandensein einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen mTORC1 und dem Insulin-/ PI3K-Signalweg zurückzuführen. Das *growth factor receptor-bound protein 10* (Grb10), ein negativer Regulator des Insulin-/ IGF1-Rezeptorsignals stromaufwärts von Akt und mTORC2, wird durch die mTORC1-vermittelte Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert, was wiederum eine Inhibition des Insulin-/ PI3K-Signalwegs zur Folge hat (P. P. Hsu et al., 2011).

1.1.2.2 Signaltransduktion downstream von mTORC2

mTORC2 steuert die Proliferation und das Überleben von Zellen hauptsächlich durch die Phosphorylierung mehrerer Mitglieder der AGC-Proteinkinase-Familie, wozu unter anderem die *cAMP-dependent protein kinase* (PKA), die *cGMP-dependent protein kinase* (PKG) sowie die *protein kinase C* (PKC) zählen (Jacinto et al., 2004). Von über 500 bekannten humanen Proteinkinasen werden 60 zur AGC-Familie gezählt (Manning et al., 2002). Während der eukaryotischen Evolution wurden sie hoch konserviert, und die Erkrankungen, in deren Kontext diese Kinasen von Bedeutung sind, sind zahlreich. Durch die Bedeutung der AGC-Kinasen wird mTORC2 zu einem zentralen Bestandteil für die Regulation der zellulären Destination, da durch dieses Netzwerk die Apoptose, verschiedene Differenzierungswege oder Alterungsprozesse gesteuert werden. Vermittelt durch diese Kinasen phosphoryliert und aktiviert mTORC2 direkt AKT sowie auch die *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* (SGK), welche unter anderem Überleben, Zellzyklus und Anabolismus kontrollieren (Fachinetti et al., 2008; García-Martínez & Alessi, 2008; Ikenoue et al., 2008; Sarbassov et al., 2005).

Das erste identifizierte mTORC2-Substrat war PKC α , ein Regulator des Aktin-Zytoskeletts (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). Später wurde gezeigt, dass mTORC2 mehrere andere Mitglieder der PKC-Familie phosphoryliert, darunter PKC δ (Gan et al., 2012), PKC ζ (X. Li & Gao, 2014) sowie PKC γ und PKC ϵ (Thomanetz et al., 2013), die alle verschiedene Aspekte des Umbaus des Zytoskeletts und der Zellmigration regulieren. Zusätzlich kontrolliert mTORC2 auch die Phosphorylierung von Paxillin und dessen Verlagerung zu fokalen Adhäsionen sowie die GTP-Beladung des *Ras homolog family member A* (RhoA) und Rac1. Der molekulare Mechanismus, durch den mTORC2 diese Prozesse reguliert, wurde bislang noch nicht bestimmt.

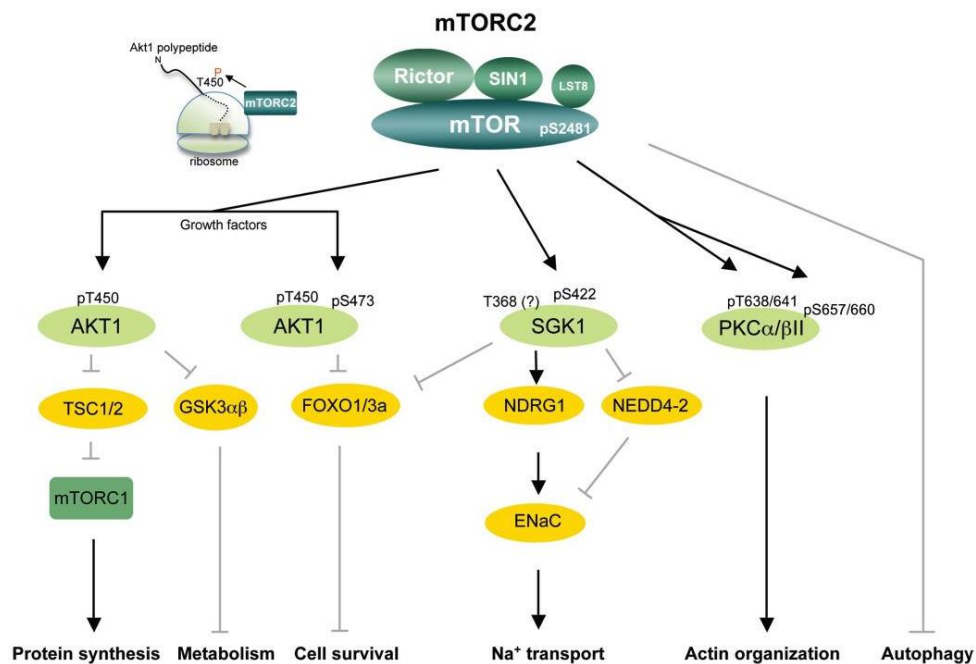


Abbildung 5: Effektoren downstream von mTORC2 und deren Funktionen. mTORC2 aktiviert die Kinasen der AGC-Familie, darunter Akt, SGK sowie PKCs, um den Metabolismus und den Ionen-transport sowie das Aktin Zytoskelett zu regulieren und das Überleben der Zellen zu fördern (Oh & Jacinto, 2011).

1.1.3 Die Rolle von mTOR im Gehirn

Innerhalb des Gehirns arrangiert der mTOR-Signalweg eine Vielzahl an neuronalen Funktionen, die sich zeitlich über alle Entwicklungsstadien erstrecken (Graber et al., 2013; Lipton & Sahin, 2014). So hat die mTOR-Signalübertragung Einfluss auf die Proliferation neuronaler Stammzellen, den Aufbau und die Aufrechterhaltung neuronaler Schaltkreise, die erfahrungsabhängige Plastizität und die Regulierung komplexer Verhaltensweisen wie Ernährung, Schlaf und zirkadiane Rhythmen (Lipton & Sahin, 2014). Eine Dysregulation von mTOR – entweder durch genetische oder chemische Störungen bedingt – ist die Hauptursache für mehrere monogenetische Störungen und ist sowohl an neurodegenerativen als auch an neuropsychiatrischen Erkrankungen beteiligt, worauf im nachfolgenden Kapitel 1.1.4 noch detailliert eingegangen wird.

Die Deletionen von entweder Raptor oder Rictor in Neuronen weisen bemerkenswert ähnliche Phänotypen auf, die durch Mikrozephalie – bedingt durch die Verringerung der Größe und Anzahl der Neuronen – und durch eine fehlerhafte Differenzierung gekennzeichnet sind (Cloëtta et al., 2013; Thomanetz et al., 2013). Darüber hinaus führt eine Raptor-Deletion im Gehirn zu einem frühen postnatalen Tod (Cloëtta et al., 2013), während die Rictor-Deletion zu einer aberranten Hirnfoliation und einer beeinträchtigten Dendritenverlängerung führt (Thomanetz et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass die Signalübertragung sowohl durch mTORC1 als auch durch mTORC2 für die

ordnungsgemäße Entwicklung des Gehirns wichtig ist. Auch wenn bislang nicht geklärt ist, welche Inputs *in vivo* – vor allem in Bezug auf das menschliche Gehirn – tatsächlich relevant sind, so wurde beobachtet, dass das Gehirn vor akuter Nährstoffunterversorgung weitestgehend geschützt ist. Das heißt, Biomasse und Funktion des Gehirns bleiben bei Nährstoffmangel oder „Hunger“ so lange wie möglich erhalten, da es bei dem Verbrauch verfügbarer Glukose- und Ketonbauteile oberste Priorität hat.

Der vom Gehirn abgeleitete neurotrophe Faktor BDNF hat sich als ein wichtiger gewebespezifischer Agonist des neuronalen mTOR-Signalwegs herausgestellt. Als PI3K-Aktivator erhöht BDNF die mTORC1-Signalübertragung in der Nähe verletzter Axone, um die Wundheilung und -reparatur zu fördern (W. L. Hsu et al., 2015; Park et al., 2008). Die BDNF Freisetzung kann wiederum durch eine Rückkopplungsschleife stromabwärts von S6K1 reguliert werden (Autry et al., 2011). Zusammen mit BDNF reguliert mTOR Lernen und Gedächtnis, indem es die Translation an Synapsen durch S6K1 und 4E-BP2 in Abhängigkeit von der neuronalen Aktivität fördert (Takei et al., 2004). Diese lokalisierte Translation ist entscheidend für den Umbau dendritischer Spines, der mit einer langfristigen Potenzierung einhergeht (Henry et al., 2017).

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass die Proteintranslation nicht der einzige mTORC1-Ertrag ist, der für die neuronale Plastizität erforderlich ist. Neben der Erzeugung neuer Proteine müssen andernorts auch überschüssige synaptische Kompartimente abgebaut werden, um die Stärke eines neuronalen Schaltkreises anzupassen. Dieser Abbau erfordert die Inhibition des mTOR-Signalwegs, durch welche der Prozess der Makroautophagie ausgelöst wird (Nikoletopoulou et al., 2017). So konnte bereits gezeigt werden, dass eine konstitutive mTOR-Hyperaktivität den synaptischen Rückschnitt beeinträchtigt, was zu autismusähnlichen sozialen Defiziten bei TSC-defizienten Mäusen führt (Tang et al., 2014a). Darüber hinaus wiesen Mäuse mit einer mTOR-Hyperaktivität weitere neuronale Anomalien wie beispielsweise Veränderungen der neuronalen Architektur und Differenzierung (Tavazoie et al., 2005b), eine veränderte Produktion multipler Axone (Choi et al., 2008), eine Vergrößerung neuronaler Somata und dendritischer Dornen sowie eine reduzierte Anzahl an dendritischen Dornen (Tavazoie et al., 2005b) auf.

Ein Einfluss durch mTOR auf die Transkription konnte im Gehirn bisher nicht endgültig nachgewiesen werden. Es konnte lediglich ein Einfluss von mTOR auf das Transkriptom in embryonalen Fibroblasten der Maus nachgewiesen werden (Düvel et al., 2010). Experimente an Rapamycin-behandelten hippocampalen Hirnschnitten zeigten jedoch keine stabilen transkriptomischen Veränderungen (Blazejczyk et al., 2017).

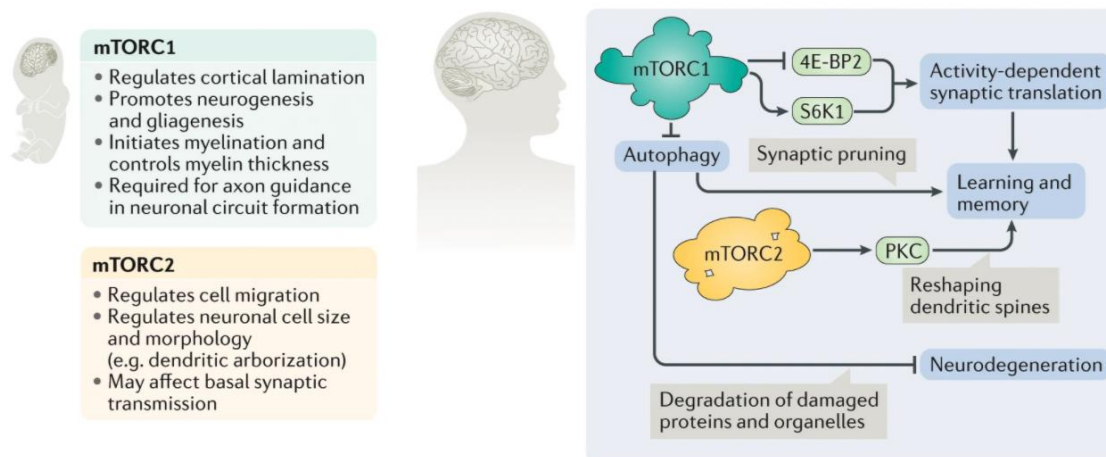


Abbildung 6: Rolle von mTORC1 und mTORC2 im Gehirn. Die Ablation von mTORC1 oder mTORC2 im Nervensystem stört die Zell- und Organgröße sowie die kortikale Architektur des Gehirns. Während mTORC1 die kortikale Laminierung reguliert, Myelinisierung initiiert und kontrolliert sowie für die Axonführung bei der Bildung neuronaler Schaltkreise verantwortlich ist, reguliert mTORC2 die Zellmigration sowie die Zellgröße und -morphologie und kann die basale synaptische Übertragung beeinflussen. Während der postnatalen Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und Homöostase reguliert mTORC1 die aktivitätsabhängige synaptische Translation durch seine Substrate 4E-BP2 und S6K1, um neuronalen Kreisläufe spezifisch zu stärken oder zu schwächen. Darüber hinaus fördert es auch die synaptische Plastizität, indem veraltete Synapsen durch Autophagie rückgebildet werden. Autophagie kann zusätzlich eine neuroprotektive Rolle spielen, indem sie fehlgefaltete Proteine und beschädigte Organellen abbaut. mTORC2 baut das Aktin-Zytoskelett als Reaktion auf die neuronale Signalübertragung um und hilft, transiente exzitatorische Ereignisse in das Langzeitgedächtnis umzuwandeln (G. Y. Liu & Sabatini, 2020).

1.1.4 mTOR Fehlregulation – klinische Bedeutung von mTOR

Eine Dysregulation des mTOR-Signalwegs ist mit einer Reihe charakteristischer neurologischer Entwicklungsstörungen verbunden, die zusammen als „mTORopathien“ bezeichnet werden. Patienten mit mTORopathien weisen einige phänotypische Gemeinsamkeiten auf, darunter Epilepsie, Autismus, Intelligenzminderung und die Bildung von Tumoren (Crino, 2015).

Die wahrscheinlich am besten untersuchte mTORopathie ist die Tuberöse Sklerose (TS), bei der Mutationen im *TSC1* oder *TSC2* Gen eine konstitutive mTORC1-Aktivität induzieren. Neben den primären Manifestationen, darunter gutartige Tumore und Läsionen verschiedenster Organe sowie Hautveränderungen, geht diese Multisystemerkrankung mit neurologisch-morphologischen Anomalien wie kortikale Tubera und subependymale Riesenzellastrozytome, aber auch mit neurologisch-funktionellen Störungen wie Epilepsie, Autismus-Spektrum-Störungen sowie geistiger Behinderung einher. Eine detaillierte Beschreibung der klinischen Manifestation der TSC ist in Kapitel 1.2 einzusehen.

Ähnliche Phänotypen finden sich bei Patienten mit Mutationen im negativen PI3K-Regulator *Phosphatase and Tensin homolog* (PTEN). PTEN ist eine Phosphatase mit doppelter Spezifität, die sowohl den PI3K / AKT- als auch den MAPK-Signalweg und

somit die mTOR-Signalübertragung hemmt (Zhou & Parada, 2012). Durch Mutationen an PTEN verursachte Erbkrankheiten werden als PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) zusammengefasst und umfassen eine Gruppe heterogener Syndrome, die eine autosomal-dominante Mutation im PTEN aufweisen (Endersby & Baker, 2008; Pilarski et al., 2013). Dazu gehören das Cowden-Syndrom, die Lhermitte-Duclos-Krankheit und das Bannayan-Riley-Ruvacalba-Syndrom. Bei der Neurofibromatose (NF1) handelt es sich um eine häufige neurokutane Störung, die durch meist gutartige Tumore des zentralen und peripheren Nervensystems gekennzeichnet ist. NF1 codiert ein GTPase-aktivierendes Protein, das die Aktivität des Protoonkogens RAS unterdrückt. In seinem aktiven Zustand signalisiert Ras an mehrere nachgeschaltete Effektoren, einschließlich der Erk- und mTOR-Signalwege (Dasgupta & Gutmann, 2005; Johannessen et al., 2005). Das Fragile X-Syndrom (FXS) ist eine der verbreitetsten genetischen Ursachen für angeborene geistige Behinderung und eine häufige Ursache für Autismus. Die Ursache des Syndroms ist der Verlust des *fragile X mental retardation protein* (FMRP), ein RNA-bindendes Protein, das an der translationalen Stummschaltung von mRNAs beteiligt ist, welche lokal in Dendriten und Postsynapsen translatiert werden. Studien konnten eine erhöhte mTOR-Aktivität und eine erhöhte Proteinsynthese in FMRP-deletierten Mäusen und Hirnproben von FXS-Patienten nachweisen (Hoeffler et al., 2008; Sharma et al., 2010). Darüberhinaus konnten Studien ebenfalls einen Zusammenhang zwischen mTOR und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Chorea Huntington aufzeigen.

1.1.5 Der Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 2 (IGF-II)

Wie bereits im Kapitel 1.1.1 angedeutet, spielt das IGF (*Insulin-like growth factor*) – Signalsystem durch seinen Einfluss auf mTOR eine entscheidende Rolle in Wachstum, Funktion und Entwicklung von Zellen und Geweben (LeRoith & Roberts, 2003). Das IGF-Signalsystem besteht aus vier unterschiedlichen Membranrezeptoren (IGFR1 und 2, Insulinrezeptor IR und Hybridrezeptoren), drei Liganden (Insulin, IGF-I und IGF-II) sowie sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) (Rikhof et al., 2009). Bei IGF-I und IGF-II handelt es sich um Peptidhormone, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin aufweisen; sie leiten sich von einem gemeinsamen Vorläufergen ab. Dabei weisen beide IGFs eine Homologie der Aminosäuren von 40% zu Insulin auf (Rinderknecht & Humbel, 1978a, 1978b). Wie die Nomenklatur bereits vermuten lässt, haben die IGFs durch ihre Bindung an IGF-I- und Insulinrezeptoren insulinähnliche Effekte, wie beispielsweise Glykogenese, Lipidogenese oder die zelluläre Aufnahme von Glukose und Aminosäuren. Da für die vorliegende Arbeit hauptsächlich der insulinähnliche Wachstumsfaktor II (IGF-II) von Relevanz war, wird dieser nachfolgend näher beschrieben.

IGF-II wird im Embryo stark exprimiert und ist für das normale embryonale und fetale Wachstum notwendig (Baker et al., 1993; DeChiara et al., 1990; J. P. Liu et al., 1993;

Ren et al., 2008; Shinar et al., 1993). Im Gegensatz dazu wird IGF-II in den meisten erwachsenen Geweben herunterreguliert, wobei Gehirn und Darm bedeutende Ausnahmen bilden.

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten einige Studien die Rolle von IGF-II im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen darstellen (Pardo et al., 2019; Y. Wang et al., 2016). Beispielsweise wiesen Patienten mit Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu Kontrollpersonen in einigen Hirnregionen eine verminderte IGF-II Expression auf, was in einer Reihe von Studien mit postmortalen Hirnproben nachgewiesen wurde (Pascual-Lucas et al., 2014a; Steen et al., 2005). Weitere Studien konnten zeigen, dass die Behandlung mit IGF-II kognitive Beeinträchtigungen in Mausmodellen von Schizophrenie und Alzheimer wieder herstellen konnten (Ouchi et al., 2013; Pascual-Lucas et al., 2014a). Zusätzlich konnten in einer Studie von Steinmetz et al. die Kerndefizite in einem Mausmodell für Autismus durch eine subkutane IGF-II-Injektion reversiert werden (Steinmetz et al., 2018b).

Darüber hinaus berichteten einige Forschungsgruppen über die Rolle von IGF-II während der Gedächtnisbildung. So können bereits mehrere Studien bestätigen, dass IGF-II als „Gedächtnisverstärker“ wirken kann (Bryzgalov et al., 2018; Iwamoto & Ouchi, 2014; Pascual-Lucas et al., 2014; Stern, Chen, et al., 2014). Chen et al. 2011 beispielsweise zeigten, dass die hippocampale Expression von IGF-II-mRNA nach der Trainingseinheit des passiven Vermeidungsparadigmas zunimmt, während der knockdown von IGF-II nach der Trainingseinheit die Gedächtnisbildung verschlechterte (Chen et al., 2011). Eine Studie von Stern et al. konnte eine Verbesserung des Lernens in verschiedenen Experimenten nach systemischer subkutaner Verabreichung von IGF-II darlegen, darunter Furchtkonditionierung, neuartige Objekterkennung und Y-Labyrinth (Stern, Kohtz, et al., 2014). In einer kürzlich durchgeführten Studie von Yu et al. konnten diese zuvor beschriebenen Effekte bestätigt werden (Yu et al., 2020a). Darüber hinaus wurde ebenfalls die Rolle des IGF2-Rezeptors in Zusammenhang mit einer verbesserten Gedächtniskonsolidierung nach IGF-II-Verabreichung herausgearbeitet, welcher essenziell für die Konsolidierung, nicht aber für das Erlernen hippocampus-abhängiger Aufgaben ist. Zusätzlich dazu wurde gezeigt, dass die Aktivierung des IGF2-Rezeptors einen Einfluss auf die Translation, nicht aber die Transkription von sogenannten unmittelbar frühen Genen hat und den trainingsabhängigen Anstieg der *de novo* Proteinsynthese kontrolliert. Auf die Rolle und Funktion von unmittelbar frühen Genen in Bezug auf Lernen und Gedächtnis wird im nachfolgenden Kapitel noch detailliert eingegangen.

All diese Daten legen nahe, dass das IGF-II-System ein vielversprechendes Ziel ist, um gestörte Funktionen des Zentralnervensystems auf therapeutische Weise zu verbessern,

weswegen dieser Wachstumsfaktor im Rahmen der vorliegenden Arbeit von großem Interesse war.

1.1.6 Unmittelbar frühe Gene – *immediate early genes*

Unmittelbar frühe Gene (*immediate early genes*; IEGs) sind Frühreaktionsgene, die als Reaktion auf neuronale Aktivität koordiniert aktiviert und dynamisch reguliert werden. Während einige IEGs als Netzwerk konstitutiv exprimierter Proteine wirken, die als Reaktion auf Aktivität oder Reiz hochreguliert werden, werden andere IEGs nur als Reaktion auf externe Stimuli aktiviert. Eben diese gelten als Marker für neuronale Aktivität. IEGs können dabei innerhalb weniger Minuten nach einer Stimulation aktiviert und transkribiert werden, ohne dass eine *de novo*-Proteinsynthese erforderlich ist; die darauffolgende Abschaltung der Transkription hingegen ist Proteinsynthese-abhängig. Die IEG-Antwort beinhaltet ein breites Spektrum verschiedener Signaltransduktoren, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, synaptische Strukturproteine und Enzyme, die für die Synthese und Freigabe von Neurotransmittern verantwortlich sind. Der Großteil der IEGs sind Transkriptionsfaktoren, die kollektiv die Expression von Genen mit verzögerter Reaktion steuern, welche an der neuronalen Plastizität beteiligt sind (Minatohara et al., 2016). Insbesondere die Expression von IEGs wie dem Transkriptionsfaktor *c-fos* oder dem aktivitätsregulierten Zytoskelett-assoziierten Protein *Arc* wird in Untergruppen von Neuronen in bestimmten Hirnregionen, die mit Lernen und Gedächtnisbildung verbunden sind, schnell und selektiv hochreguliert. Trotz der vielen Beweise für die Rolle von IEGs bei der synaptischen Plastizität bleiben die molekularen und zellulären Mechanismen, die mit diesen Prozessen verbunden sind, noch weitestgehend unklar.

Viele Studien konnten zeigen, dass IEGs wie *Arc*, *c-fos* oder *zif268* in bestimmten Hirnregionen während neuronaler Aktivität im Zusammenhang mit Verhaltensaufgaben induziert werden. Im Hippocampus, dem Zentrum der deklarativen Gedächtnisbildung, erfolgt eine schnelle Transkription dieser IEGs während Hippocampus-basierten Lernparadigmen, wie beispielsweise dem Morris-Wasserlabyrinth oder der kontextuellen Furchtkonditionierung (Guzowski et al., 2001; Hall et al., 2001; Ramírez-Amaya et al., 2005; Vann et al., 2000). In einer Studie mit Ratten wurden im Rahmen des Objekterkennungstests die Expressionsmuster der IEGs *c-fos* und *zif268* in unterschiedlichen Gehirnregionen untersucht (Barbosa et al., 2013). Dabei konnte neben einer erhöhten hippocampalen Expression von *c-fos* nach der Exploration eines unbekanntes Objektes auch eine erhöhte *zif268* Expression im Hippocampus nach der kontextabhängigen episodischen Gedächtnisbatterie gezeigt werden, wodurch bewiesen wurde, dass die IEGs *c-fos* und *zif268* ein erhöhtes Expressionsmuster nach einem Explorationsevent neuer Lerninhalte in damit assoziierten Gehirnregionen aufweisen.

Die Transkription der IEGs erfolgt über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs, welcher wiederum über eine Rückkopplungsschleife durch den mTOR-Signalweg reguliert wird (Carracedo et al., 2008a; O'Donnell et al., 2012). Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu einer Hochregulation verschiedener IEGs wie beispielsweise *c-fos* führt (Murphy & Blenis, 2006). Eine Dysregulation von mTOR könnte demnach Einfluss auf die Expression verschiedener IEGs durch fehlregulierte Aktivität des MAPK-Signalwegs haben.

1.2 Tuberöse Sklerose

Die Tuberöse Sklerose (TS) ist eine autosomal-dominant vererbte Multisystem-Erkrankung, welche durch Mutationen des *TSC1* oder *TSC2* Gens verursacht wird. Sie bietet ein vielfältiges Krankheitsbild mit moderat bis schwerwiegenden Ausprägungen, mit unter anderem Hautmanifestationen bis hin zu Fehlbildungen und Tumoren des Gehirns sowie anderer Organsysteme, Epilepsien und Intelligenzminderung. Die TS zählt zu den Neurokutanen Syndromen, welche Erkrankungen mit Fehlbildungen im Bereich der Haut und des Nervensystems vereint.

Erste Dokumentationen dieser Erkrankung reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Während der Pariser Dermatologe Rayer bereits 1835 erstmalig eine Darstellung einer Patientin mit faszialen Angiofibromen im *Atlas der Hautkrankheiten* abbildete (*Traité Théorique et Pratique Des Maladies de La Peau - P. Rayer - Google Books*, n.d.), beschrieb der Neurologe Désiré-Magloire Bourneville die TS erstmalig als eine eigene neue Sonderform der Epilepsie und zusätzlich das Vorkommen sogenannter Tuber im Gehirn betroffener Patienten (BOURNEVILLE & DM, 1880). Weitere Beschreibungen durch den Neurologen Édouard Brissaud und den Hautarzt John James Pringle gaben der TS den Alternativnamen Bourneville-Brissaud-Pringle Syndrom. Auch deutsche Mediziner machten sich um die frühe klinische Erforschung verdient, indem beispielsweise Heinrich Vogt 1908 als erster die vielen bis dahin eigenständig beschriebenen Symptome zu dem Krankheitsbild der TS zusammenfasste (Vogt, Priv.-Doz. Dr., 1908). Kurz danach erkannte Hermann Berg die TS erstmals als autosomal dominante Erbkrankheit an (Berg, 1913). Mit dem technischen und wissenschaftlichen Fortschritt ab der Mitte des 20. Jahrhunderts wurden weitere wichtige Erkenntnisse, besonders auf molekulargenetischer Ebene, gewonnen. Ein Meilenstein gelang vor allem durch die Identifikation der Gene *TSC1* und *TSC2* und deren Mutation als Ursache der Erkrankung (Fryer et al., 1987; Kandt et al., 1992), sowie durch die Identifikation ihrer Genprodukte Hamartin (*TSC1*) und Tuberin (*TSC2*) in den Jahren 1993-1997 (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993a; van Slegtenhorst et al., 1997). Weiterhin ist als jüngerer Erfolg die Identifikation verschiedener Protein-Signalkaskaden, welche durch die jeweilige Mutation beeinflusst werden, zu verzeichnen,

wo vor allem die mTOR-Signalskaskade als zentrales Element hervorgeht (Inoki et al., 2002; Tee et al., 2002).

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

TS tritt mit einer Prävalenz von 1:8000 in der Bevölkerung auf (Kristof et al., 2015), wobei beide Geschlechter und alle ethnischen Gruppen gleichermaßen betroffen sind, sowohl Kinder als auch Erwachsene (Curatolo et al., 2015; O’Callaghan et al., 1998). Die Penetranz, also das Auftreten von Symptomen bei einer Mutation, liegt bei über 95 % (Jones et al., 1999). Die Expressivität einzelner Merkmale ist dabei sehr variabel und reicht von leichten dermatologischen Symptomen mit normaler Lebenserwartung bis hin zu anhaltender Epilepsie und schwerer geistiger Behinderung. Selbst innerhalb von Mitgliedern einer Familie, die dieselbe Mutation tragen, gibt es verschiedene Manifestationen und Verläufe (Curatolo et al., 2015). In etwa zwei Dritteln der Fälle entsteht die TS durch Spontanmutationen und in etwa einem Drittel ist eine hereditäre Form ursächlich für die Erkrankung (Curatolo & Bombardieri, 2007). Bislang sind zwei verschiedene Genloci bekannt: *TSC1* (OMIM 605284; 9q34) und *TSC2* (OMIM 191092; 16p13.3). Umfangreiche Studien haben ein weites Spektrum an Mutationen aufgedeckt; hierbei konnten für den *TSC1* Locus mehr als 200 und für den *TSC2* Locus mehr als 700 Allelvarianten identifiziert werden (Sancak et al., 2005)..

1.2.2 Klinische Manifestationen

Der Funktionsverlust des Hamartin-Tuberin-Komplexes führt zu einer erhöhten Zellproliferation und einer abnormalen Zelldifferenzierung, welches zur Ausbildung sogenannter Hamartome, also gutartiger Tumore, führt, welche das umgebende Gewebe nicht infiltrieren. Sie sind in einer Vielzahl von Geweben und Organen wie Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Auge und Haut zu finden (Northrup et al., 2013; Orlova & Crino, 2010). Bei mehr als 90 % der Betroffenen kommen noch neurologische Symptome hinzu (Jeste et al., 2008). Die Vielfältigkeit der möglichen Organbeteiligungen unterstreicht die Tatsache, dass es sich bei der TS um eine multidisziplinäre Erkrankung handelt (zusammengefasst in Abb. 7).

Die Expression der klinischen Manifestationen ist altersabhängig (Curatolo & Bombardieri, 2007). So ist festzustellen, dass Hypopigmentierungen, auch Eschenlaubflecken genannt, bereits bei oder kurz nach der Geburt vorhanden sind (Ebrahimi-Fakhari et al., 2017; Józwiak et al., 2000), während sich die charakteristischen Fibroadenome meist erst während der Pubertät entwickeln (Trauner et al., 2003). Neurologische Symptome treten in der Regel erst im Laufe der ersten Lebensjahre auf (Humphrey et al., 2004). Trotz der Spezifität der Symptomatik besteht häufig eine Latenzzeit zwischen Auftreten der initialen Symptome und der Diagnose TS.

Nachfolgend wird ausschließlich auf die neurologischen Manifestationen eingegangen, da die weiteren Manifestationen für die vorliegende Arbeit nicht von Relevanz waren.

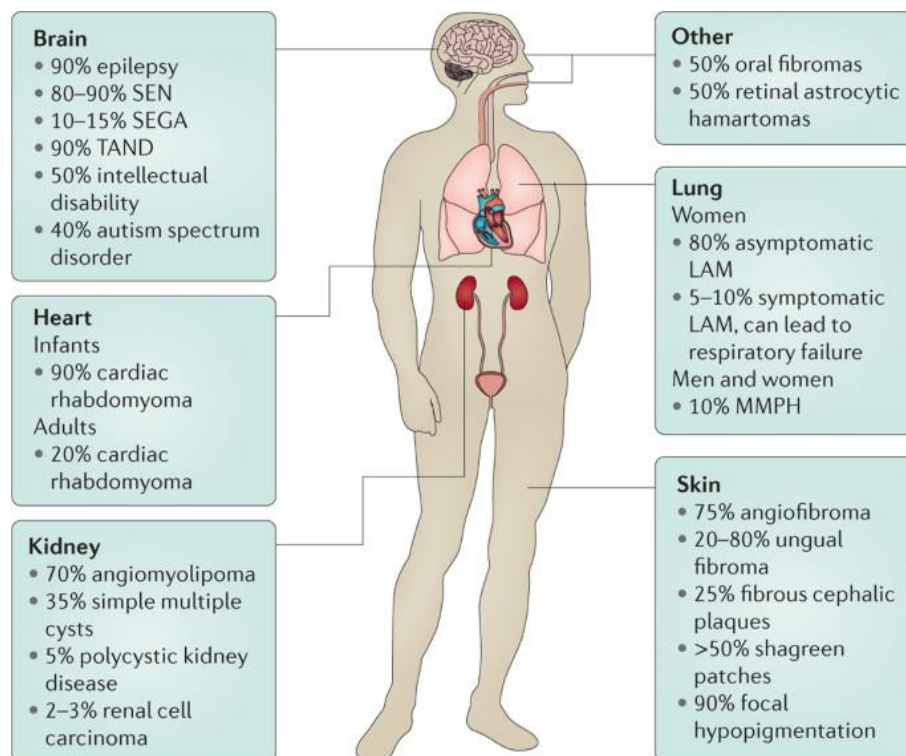


Abbildung 7: Klinische Manifestationen der Multisystemerkrankung Tuberöse Sklerose. Gezeigt werden die am häufigsten betroffenen Organsysteme und die damit einhergehenden Läsionen. Die Prozentsätze stellen die ungefähre Inzidenz bei Patienten mit TSC dar. SEN: Subependymaler Knoten; SEGAs: subependymales Riesenzellastrozytom; TAND: TSC assoziierte neuropsychiatrische Störungen; LAM: Lymphangiomeleiomyomatose; MMPH: multifokaler mikronodulärer Pneumozyt (Henske et al., 2016).

1.2.2.1 Neurologische Manifestationen

1.2.2.1.1 Neurologisch-morphologisch

Die Kortikalen Tubera, die subependymalen Knoten (SENs) und die subependymalen Riesenzellastrozytome (SEGAs) zählen zu den wichtigsten Manifestationen des Zentralnervensystems (ZNS).

Kortikale, subkortikale und zerebelläre Tubera sind namensgebend für die Tuberöse Sklerose und liegen bei etwa 90 % der betroffenen Personen vor. Hierbei handelt es sich um Vorwölbungen im Bereich der Hirnrinde, deren Anzahl und Lokalisation stark variabel ist. Die Tubera persistieren lebenslang ohne zu wachsen, sie können jedoch kalzifizieren oder zystisch degenerieren (Crino et al., 2006). Diese schweren Fehlbildungen entstehen bereits *in utero* während der Kortikogenese (Wortmann et al., 2008) und können schon in frühen Schwangerschaftswochen mittels hochauflösender Magnetresonanztomographie dargestellt werden (Levine et al., 2000). Anatomische

Störungen des Kortex beeinträchtigen die neuronale Funktion und Plastizität und beeinflussen dendritisches sowie axonales Wachstum. Symptomatisch machen sich die kortikalen Tubera durch schwer beherrschbare Epilepsien und kognitiven Beeinträchtigungen bemerkbar (Jansen et al., 2008; Mohamed et al., 2012).

Subependymale Knoten hingegen sind kalzifizierte Hamartome und enthalten vergrößerte Neurone und Gliazellen sowie vielkernige Riesenzellen (Taraszewska et al., 1997). Sie entstehen meist *in utero* aus neuronalen Vorläuferzellen, ausgehend von der subependymalen Wand der Seitenventrikel und können bei etwa 80 % der Erkrankten nachgewiesen werden (Roth et al., 2013; Sampson, 2003). SENs, welche nah am Foramen Monroi lokalisiert sind, haben ein erhöhtes Risiko, sich zu subependymalen Riesenzellastrozytomen (SEGAs) weiterzuentwickeln.

Diese SEGAs entwickeln sich mit einer Häufigkeit von 5-15 % aller TS Fälle, meist in der späten Kindheit und im Jugendalter. Histologisch bestehen sie aus langsam wuchernden Astrozyten und Riesenzellen und enthalten Neurone und Gliazellen mit verändertem Cytoplasma und exzentrischem Nukleus mit großem Nukleolus (Ess et al., 2005; Grajkowska et al., n.d.). Dennoch können die SEGAs zu schweren Komplikationen wie Erblindung führen, wenn sie durch ihre Lage den Liquorabfluss behindern und so zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes führen (Goh et al., 2004). Eine Behandlung mit dem mTOR Inhibitor Everolimus führt zwar zu einer Größenreduktion der SEGAs, allerdings ist eine dauerhafte Behandlung notwendig, da sie ansonsten erneut wachsen (Franz et al., 2013).

1.2.2.1.1 Neurologisch-funktionell

Neurologische Manifestationen gehören zu den Hauptursachen für Morbidität bei Patienten mit TS. Hierbei ist die Epilepsie das häufigste Symptom und betrifft 80-90 % der Erkrankten, bei 75 % beginnend während des ersten Lebensjahres, bei denen es sich vor allem um sogenannte Blitz-Nickel-Salaam-Anfälle (BNS-Anfälle, infantile Spasmen) handelt (Kotulska et al., 2014). In 70 % sind diese das Initialsymptom einer TS. BNS-Anfälle sind im Verlauf regressiv, weisen jedoch auf eine schlechte Prognose hinsichtlich der Entwicklung hin (Glaze et al., 1988) und sind oft verbunden mit Verzögerungen in der psychomotorischen Entwicklung, abnormer Sprache und autistischem Verhalten (Kotulska et al., 2014; Overwater et al., 2015). Tritt die Epilepsie erstmals im Kindesalter auf, ist sie oftmals assoziiert mit Aufmerksamkeitsstörungen und Angst-Syndromen sowie psychiatrischen Problemen im Erwachsenenalter. Es konnte eine Korrelation zwischen der Quantität kortikaler Tubera und der Ausprägung von Epilepsie beziehungsweise einer kortikalen Dysfunktion gezeigt werden (Goodman et al., 1997).

Kognitive Defizite und Intelligenzminderung zeigen sich in 50-60 % der Fälle, wobei die Schwere mit dem Genlocus sowie der Lokalisation und Anzahl der Tubera im Gehirn

korreliert (Asato & Hardan, 2004; Curatolo et al., 2002). Hier ist festzuhalten, dass *TSC2* Patienten häufiger und schwerwiegender betroffen sind als *TSC1* Patienten. Auch die Anzahl subependymaler Noduli vor allem im frühen Säuglingsalter begünstigt eine höhere Inzidenz von Intelligenzminderung und Krampfanfällen (Goodman et al., 1997). 30% der Patienten gelten als schwer geistig behindert (IQ < 20) und zeigen in ihrer Entwicklung kaum Fortschritte. Bei 15% liegt eine milde bis moderate geistige Behinderung vor und bei 55% ist der durchschnittliche IQ größer 70.

Die Rate an Lernschwierigkeiten im Sinne von Mehrfähigkeitsstörungen und Sprachentwicklungsverzögerung unter den Kindern mit Tuberöser Sklerose wird auf ein Vielfaches höher als in der Normalbevölkerung geschätzt. Kinder mit TS sind in 60-80 % der Fälle hyperaktiv und zeigen in etwa 13 % ein gesteigertes Aggressionspotenzial. Assoziiert mit epileptischen Anfällen treten vermehrt Schlafstörungen auf (Bruni et al., 1995).

Bei bis zu 50 % der TS Patienten kann zusätzlich eine Autismus-Spektrum-Störung vorliegen (Bolton & Griffiths, 1997), wobei umgekehrt bei 3-4 % der autistischen Personen TS als Grunderkrankung diagnostiziert wird (GILLBERG, 2008). Autismus ist eine genetisch heterogene neuropsychologische Erkrankung, welche bereits im frühen Kindesalter auftritt und durch Beeinträchtigung von Kommunikation, sozialer Interaktion und eingeschränkte sowie stereotype Verhaltens- und Aktivitätsmuster charakterisiert ist (Curatolo et al., 2004). Auch hier korreliert die autistische Störung mit dem klinischen Symptom der Epilepsie und der Intelligenzminderung, wobei kein direkter Zusammenhang zwischen infantilen Spasmen und späteren autistischen Störungen gezeigt werden konnte (Curatolo et al., 2004). In neurologischen Untersuchungen konnten Veränderungen innerhalb des frontalen und temporalen Lappens und des Nucleus caudatus bei autistischen Kindern festgestellt werden – Bereiche, in denen das Protein Tuberin (*TSC2*) eine besonders wichtige Rolle spielt (Asano et al., 2001).

All diese neuropsychiatrischen Manifestationen werden terminologisch als TAND (Tsc-Associated neuropsychiatric disorder) zusammengefasst. Eine strukturierte symptomatische Bewertung, welche als TAND-Checkliste bekannt ist, kann hilfreich sein, um diese Symptome systematisch zu überprüfen und dadurch individuell angepasste Therapien und Förderungen zu entwickeln, um den Leidensdruck der Patienten und ihrer Angehörigen möglichst gering zu halten.

1.2.3 Molekulare Grundlagen

1.2.3.1 Genetischer Hintergrund

1987 konnten Fryer et al. erstmalig einen Zusammenhang zwischen der Bande 34 des langen Arms von Chromosom 9 (9q34) und der TS feststellen (Fryer et al., 1987), kurz

darauf wurde 1992 durch Kandt et al. Chromosom 16 (16p13.3) als zweiter Genlokus beschrieben (Kandt et al., 1992) – die beiden identifizierten Gene wurden *Tsc1* (*tuberous sclerosis complex subunit 1*) und *Tsc2* (*tuberous sclerosis complex subunit 2*) genannt, und deren pathogenen Defekte sind ursächlich für die TS. Bei *Tsc1* und *Tsc2* handelt es sich um so genannte Tumor-Suppressor-Gene, welche Zellzyklus und -wachstum regulieren. Das *Tsc1*-Gen beinhaltet 23 Exons bei ca. 55 kb DNA, wobei sein Transkript 8,6 kb umfasst (van Slegtenhorst et al., 1997). Das *Tsc2*-Gen hingegen beinhaltet mit einer Größe von 40 kb DNA 41 Exons, welche für ein 5,5 kb großes Transkript kodieren (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993b). Die dabei entstehenden Proteine Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2) haben außer einer Sequenzhomologie in ihren coiled-coil Domänen, welche die Proteininteraktionen vermitteln, keine Ähnlichkeiten (Serfontein et al., 2011). Eine Übersicht der Eigenschaften der beiden Gene ist in Tabelle 1 einzusehen.

Nach dem Knudson'schen „Zwei-Treffer-Modell“ bedarf es einen Verlust beider Allele eines Tumorsuppressor-Gens, um auf zellulärer Ebene zur Ausbildung einer Erkrankung bzw. zu unkontrolliertem Zellwachstum zu führen (Green et al., 1994; Knudson, 2001). Dies bedeutet, dass durch eine initiale Funktionsverlustmutation zunächst ein Allel inaktiviert wird, während durch ein späteres davon unabhängiges somatisches Ereignis das verbleibende gesunde Allel ebenso inaktiviert wird. Diese zweite Mutation erfolgt demnach nicht in allen Zellen eines Organismus, was letztlich nur in betroffenen Zellen zu einer gestörten Funktion des Zellzyklus und dadurch zu einer lokal begrenzten geweblichen Fehlentwicklung führt. Dies wird als Verlust der Heterozygotie (LOH) bezeichnet. Dieser LOH kann bei TS vielfach nachgewiesen werden; beispielsweise findet er sich in Zellen aus Angiomyolipomen und subependymalen Riesenzellastrozytomen, dafür kaum in Gewebe aus Tubera (Crino et al., 2006). Dies erklärt, warum TS Betroffene an vielen Stellen lokal begrenzte Veränderungen aufweisen und lebenslang neue Tumore entwickeln können. Etwa zwei Drittel der TS Erkrankten tragen Keimbahnmutationen, die bei manchen als Mosaik ausgeprägt sind, während bei einem Drittel der Patienten die Mutation autosomal dominant von einem Elternteil ererbt wurde. Als genetischen Mosaik bezeichnet man einen Organismus, bei dem eine spezifische Mutation nur in einem Teil der Körperzellen ausgeprägt wird. Diese Patienten weisen oftmals einen mildereren Phänotypen auf, können die Mutation aber trotzdem weitervererben, sofern die Keimzellen auch die Mutation aufweisen.

Bis heute sind mehr als 1800 verschiedene TS-verursachende Mutationen bekannt, welche über die kodierenden Regionen der beiden Gene verteilt sind (Nellist et al., 2015). Laut einer Studie von Kwiatkowski et al. sind die häufigsten Mutationen auf dem *Tsc1*-Gen Deletionen und Nonsense-Mutationen – Insertionen und Spleiß-Mutationen sowie Missense-Mutationen finden sich kaum (D. Kwiatkowski et al., 2011). Auf dem *Tsc2*-Gen hingegen finden sich Missense-Mutationen gemeinsam mit Deletionen und

Nonsense-Mutationen am häufigsten – Insertionen und Spleiß-Mutationen sind eher selten. Große genomische Deletionen sind eher selten im *Tsc1*, dafür häufiger im *Tsc2*-Gen zu finden. Die Anzahl aller beschriebenen genomischer Deletionen auf dem *Tsc2*-Gen beläuft sich auf über 130 (Kozlowski et al., 2007; Longa et al., 2001), wohingegen nur 9 für *Tsc1* beschrieben sind (Kozlowski et al., 2007; Longa et al., 2001; Nellist et al., 2005). Die Mutationen sind über die gesamte jeweilige Region der beiden Gene verteilt, sogenannte „hot spots“ wurden bislang nicht beschrieben. Dennoch gibt es für bestimmte Regionen gewisse Mutationshäufigkeiten; so sind beispielsweise ein Viertel aller *Tsc1*-Mutationen auf Exon 15 zu finden (D. Kwiatkowski et al., 2011), auf dem *Tsc2*-Gen scheint die GAP-Domäne von Exon 35-39 häufig mutiert zu sein (Maheshwar et al., 1997). In der „Leiden Open Variation Database“ (LOVD) sind zum jetzigen Zeitpunkt in *Tsc1* 1356 und in *Tsc2* 4067 einmalige Sequenzvarianten einschließlich benigner Polymorphismen und nicht klassifizierter Varianten katalogisiert (http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC1; http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC2).

Die Erstellung einer mutationspezifischen Genotyp-Phänotyp-Korrelation gestaltet sich für die TS aufgrund der hohen Variationsbreite der klinischen Manifestationen als schwierig. Bislang konnte jedoch nachgewiesen werden, dass *Tsc1*-Mutationen in der Regel zu einem mildereren Krankheitsbild führen als *Tsc2*-Mutationen (Au et al., 2007; Kozlowski et al., 2007; Sancak et al., 2005). Bei *Tsc2*-Patienten nehmen vor allem Epilepsien und Intelligenzminderung einen schwereren Verlauf und treten häufiger auf als bei *Tsc1*-Patienten, ebenso sind kortikale Tubera, retinale Hamartome und fasziale Angiofibrome häufiger bzw. ausgeprägter (Dabora et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass familiär vererbte Mutationen meist ein mildereres Krankheitsbild verursachen als *de novo* Mutationen (Au et al., 2007; Sancak et al., 2005).

Tabelle 1: Übersicht der Eigenschaften von *Tsc1* und *Tsc2* (verändert nach (Curatolo & Bombardieri, 2007))

	<i>Tsc1</i>	<i>Tsc2</i>
Lokalisation	9q34	16p13.3
Größe des Gens	55 kb	40 kb
Anzahl Exons	23 (21 kodierend)	42 (41 kodierend)
Größe Transkript	8,6 kb	5,5 kb
Mutationshäufigkeit	10-15 % spontan	75-80 % spontan
Protein	Hamartin	Tuberin
Größe des Proteins	1164 Aminosäuren, 130 kDa	1807 Aminosäuren, 180 kDa

1.2.3.2 Die Proteine Tuberin und Hamartin – der TSC-Komplex innerhalb des mTOR Signalweges

Die Gene *Tsc1* und *Tsc2* kodieren für die Proteine Hamartin und Tuberin, welche gemeinsam mit dem Protein TBC1-Domänenfamilienmitglied 7 (TBC1D7) den heterotrimeren TSC-Proteinkomplex bilden (Dibble & Cantley, 2015; D. J. Kwiatkowski & Manning, 2005), welcher den mTOR Signalweg negativ reguliert (Dibble et al., 2012). Das Protein Hamartin umfasst 1164 Aminosäuren mit einer Größe von 130 kDa, die Interaktion mit Tuberin findet in der Region der Aminosäuren 302 bis 430 statt. Tuberin hingegen ist mit 180 kDa und 1807 Aminosäuren schwerer als Hamartin; hier befindet sich die interagierende „coiled-coil“ Domäne zwischen Aminosäure 1 und 418. Während der Interaktion wird Tuberin durch Hamartin stabilisiert, indem es dessen Ubiquitin-assoziierten Abbau verhindert (Napolioni & Curatolo, 2008; Orlova & Crino, 2010).

In vielen Zelltypen resultiert eine Funktionsverlustmutation innerhalb des *Tsc1* oder *Tsc2* Gens in einer Störung des TSC Proteinkomplexes, was zu einer Akkumulation des aktivierenden Rheb-GTP führt. Dies bewirkt einen dysregulierten, konstitutiv aktivierten mTORC1 und dessen downstream Effektoren sowie gleichzeitig eine verringerte mTORC2 Aktivität (Laplante & Sabatini, 2012; C. Li et al., 2014). Eine mTOR Hyperaktivität bewirkt neben einer erhöhten Proteintranslation auch eine Umprogrammierung von Glykolyse, Autophagie sowie Nukleotid- und Lipidbiosynthese (Dibble & Cantley, 2015; Kim & Guan, 2015; D. J. Kwiatkowski & Manning, 2005). Durch die daraus resultierende Veränderung von Zellwachstum und Proliferation wird die Entstehung von Tumoren sowie die Bildung der für die TS charakteristischen Hamartome verschiedener Organsysteme begünstigt (J. Huang & Manning, 2008; D. J. Kwiatkowski & Manning, 2005). Im Gehirn kann die Hyperaktivität von mTORC1 zu Veränderungen in synaptischer Morphologie, Migration und Orientierung sowie fehlregulierter synaptischer Plastizität und dendritischem Wachstum führen (Aronica & Crino, 2014).

1.2.4 *In vivo* Modelle

Eine Reihe von experimentellen Organismen wurde in den letzten Jahren als Modellsystem für die TS verwendet, darunter *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheffe), *Candida albicans*, *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Mus musculus* (Maus) und *Rattus norvegicus* (Ratte). Studien legen nahe, dass Ratte und Maus die aus evolutionärer Sicht besten Modellorganismen sind (Howe et al., 2015). Die in Tiermodellen verwendeten Mutationen stellen jedoch nur eine kleine Stichprobe der Vielfalt von Mutationen dar, die bei der menschlichen TS beobachtet werden.

Ein weit verbreitetes Rattenmodell für die TS ist die sogenannte Eker-Ratte, die erstmals 1954 von Reidar Eker beschrieben wurde (EKER, 1954) und eine heterozygote Mutation

im *Tsc2*-Gen trägt. Untersuchungen der hippocampalen synaptischen Plastizität bei 30 bis 50 Tage alten Eker-Ratten ergaben, dass die Langzeitpotenzierung (LTP) und -depression (LTD) – zwei synaptische Mechanismen, die eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Erregbarkeit des neuronalen Netzwerks und der synaptischen Homöostase spielen – in *TSC2*^{+/-} Ratten verringert sind (von der Brellie et al., 2006). Mithilfe neurologischer Verhaltensstudien versuchten mehrere Forschungsgruppen, die kognitiven Störungen in jungen Eker-Ratten aufzuklären (Mizuguchi et al., 2000; Takahashi et al., 2004; Waltereit et al., 2006; Yeung et al., 1997). Der einzig signifikante Unterschied zu Kontrolltieren konnte hier bei der Testung des episodischen Gedächtnisses verzeichnet werden (Steele & Morris, 1999). Weitere Verhaltenstests zeigten keine zusätzlichen Beeinträchtigungen. Insgesamt bleibt der Nutzen von Eker-Ratten als Modell für neurologische oder Verhaltenssymptome zur Erforschung der TS umstritten und erfordert weitere experimentelle Analysen.

Jüngste Studien mit verschiedenen Mausmodellen für TS haben bedeutende Einblicke in Mechanismen geliefert, die zur Pathogenese von TS-bezogenen neuropsychiatrischen Manifestationen beitragen können. Mäuse wurden mit inaktivierenden Mutationen im *Tsc1*- oder *Tsc2*-Gen erzeugt, wobei eine Homozygotie für diese Mutationen in embryonaler Letalität resultiert (D. J. Kwiatkowski et al., 2002; Onda et al., 1999). Heterozygote Mutanten hingegen sind lebensfähig und wurden unter anderem in Hinblick auf ihren neurologischen Phänotypen bewertet.

Goorden et al. stellten in einem konventionellen *Tsc1*^{+/-} Mausmodell fest, dass diese Tiere Beeinträchtigungen im Lernen und der Gedächtnisbildung im Morris-Wasser-Labyrinth zeigten (Goorden et al., 2007a). Zusätzlich dazu zeigten diese Mäuse während des Furcht-Konditionierungsparadigma eine geringere Furchtreaktion, was ebenfalls auf eine hippocampusabhängige Gedächtnisstörung hindeutet (Goorden et al., 2007a). Weiterhin ergaben zusätzliche Tests eine gestörte soziale Interaktion sowie ein gestörtes Nestbauverhalten (Goorden et al., 2007a). Für alle Verhaltensversuche wurden Tiere im Alter von 2,5-6 Monaten verwendet. Für die Testung der sozialen Interaktion wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet, die anderen Studien wurden an männlichen Tieren durchgeführt.

Ehninger et al. führten detaillierte Verhaltensanalysen bei heterozygoten *Tsc2*^{+/-} Mäusen durch (Ehninger et al., 2008a). Verwendet wurden Männchen und Weibchen im Alter von 2-6 Monaten. *Tsc2*^{+/-} -Mäuse zeigten bei drei hippocampusabhängigen Aufgaben Lern- und Gedächtnisstörungen – im Morris-Wasser-Labyrinth, im achtarmigen Labyrinth zur Testung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses und während eines Furcht-Konditionierungsparadigma. Motorische Koordination, soziale Interaktion, Angstverhalten und exploratives Verhalten waren unverändert (Ehninger et al., 2008a). Weiterhin zeigten Ehninger et al. bei der Untersuchung der Langzeitpotenzierung (LTP),

dass diese $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse eine niedrigere Schwelle für die Induktion einer Spätphasen-LTP im Hippocampus aufweisen, was als Ursache für die Verhaltensanomalien betrachtet wurde. Systemische Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin normalisierte sowohl das Lernverhalten als auch die synaptische Plastizität.

Auerbach et al. verglich die Auswirkungen einer heterozygoten $Tsc2^{+/-}$ -Mutation mit denen einer *Fmr1*-Mutation als Modell für des Fragile-X-Syndrom in Hinblick auf die Proteinsynthese, synaptische Plastizität des Hippocampus und das Verhalten (Auerbach et al., 2011). In hippocampalen Schnitten junger $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse wurde eine reduzierte-metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR)-abhängige Langzeitdepression (LTD) festgestellt. Als mögliche Erklärung wurde ein kompensatorischer Effekt aufgrund der Hyperphosphorylierung des *FMRP*-Gens angenommen. Die erhöhte Phosphorylierung von *FMRP* soll hierbei die Repression der Translation verstärken und somit bei einer Überaktivität der mTOR-Signalkaskade die erhöhte Translation kompensiert (Auerbach et al., 2011; Troca-Marín et al., 2012). Weiterhin konnte eine Verringerung der Proteinsynthese in Bezug auf die Translation LTD-abhängiger Proteine gefunden werden. Sato et al. beschrieben 2012, dass sowohl $Tsc1^{+/-}$ - als auch $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse (Männchen und Weibchen) im Alter von 8-10 Wochen Beeinträchtigungen im sozialen Verhalten aufweisen, während kognitive Beeinträchtigungen nicht zu beobachten waren (Sato et al., 2012).

Tang et al. testeten $Tsc2^{+/-}$ -Männchen im Alter von 30 bis 35 Tagen und fanden keine Anomalien in Motorkoordination und Angstverhalten sowie kein repetitives Verhalten, jedoch Beeinträchtigungen in der sozialen Interaktion vorlagen (Tang et al., 2014b). Im Test zur Erkennung neuartiger Objekte verbrachten $Tsc2^{+/-}$ -Mäuse weniger Zeit mit der Erforschung des neuartigen Objekts als ihre wildtypischen Geschwistertiere, ohne Unterschied in der Explorationszeit, was auf einen Gedächtnisdefekt schließen lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit zu dem menschlichen TSC Proteinkomplex als auch der Aberrationen im Verhalten, die Maus der bislang am besten geeignete Modellorganismus für die TSC zu sein scheint. Jede spezifische Mutation kann hierbei spezifische pathologische und phänotypische Auswirkungen haben, weswegen verschiedene Studien mit verschiedenen Mauslinien unterschiedlicher Mutationen im *Tsc1* oder *Tsc2* Gen zu verschiedenen Ergebnissen sowohl im Verhalten als auch auf anatomischer Ebene führen können.

1.3 Gedächtnisbildung und -konsolidierung

1.3.1 Gedächtnis

Das Gedächtnis beschreibt die Fähigkeit des Gehirns, aufgenommene Informationen zu speichern und erneut abzurufen. Ermöglicht werden diese Prozesse durch das Prinzip der neuronalen Plastizität, worauf im Verlauf dieses Kapitels noch detailliert eingegangen wird.

Es werden drei zeitlich hintereinander geschaltete Gedächtnissysteme unterschieden: der sensorische Speicher oder auch Ultrakurzzeitgedächtnis, das Kurzzeit- bzw. Arbeitsgedächtnis und das Langzeitgedächtnis. Neben der chronologischen und inhaltlichen Einordnung kann das Gedächtnis auch nach prozessspezifischen Aspekten unterteilt werden: die Enkodierung, Konsolidierung und der Abruf von Informationen (Hübener & Bonhoeffer, 2010). Um eine langfristige Speicherung zu ermöglichen, müssen die Informationen aus dem Arbeitsgedächtnis in das Langzeitgedächtnis überführt werden; dieser Vorgang wird als Konsolidierung bezeichnet und wird nachfolgenden noch näher beleuchtet.

1.3.2 Gedächtnisbildung

Die Bildung des Gedächtnisses geschieht als dreistufiger Prozess der Informationsverarbeitung, bestehend aus Enkodierung, Konsolidierung und Abruf (Born et al., 2006; Winters et al., 2008). Unter Enkodierung versteht man das Abspeichern von Informationen im Gedächtnis zum Zweck der langfristigen Speicherung und des späteren Abrufens. Diese erste Speicherform ist sehr instabil und kann durch äußere Einflüsse wie beispielsweise interferierende Informationen leicht verloren gehen. Die Phase der Enkodierung dauert also pauschal gesagt so lange an, wie ein zu memorierender Reiz präsentiert wird. Zur Fundierung neu gewonnener Gedächtnisinhalte bedarf es weiterer Prozesse; diese werden als Konsolidierung bezeichnet und festigen das neu Erlernte durch Verknüpfung mit bereits vorhandenen Inhalten.

Die Speicherung und Festigung der Gedächtnisinhalte erfolgt auf zellulärer bzw. synaptischer und systemischer Ebene (Dudai, 2004; Takeuchi et al., 2014). Auf zellulärer Ebene ist die synaptische Plastizität wichtig für die Stärkung der synaptischen Übertragung. Schon während der ersten Minuten bis Stunden nach der Enkodierung kommt es zur synaptischen Konsolidierung in den neuronalen Netzwerken, welche an der Enkodierung beteiligt waren. Das Standardmodell der synaptischen Konsolidierung legt nahe, dass Änderungen der synaptischen Proteinsynthese und des Membranpotentials durch eine Aktivierung intrazellulärer Transduktionskaskaden erreicht werden. Diese Kaskaden aktivieren Transkriptionsfaktoren, die wiederum zu einer veränderten Genexpression führen. Dadurch wird die Komposition synaptischer Proteine verändert

sowie synaptisches Wachstum und synaptische Remodellierung gesteuert. In einem kurzen Zeitraum unmittelbar nach dem Lernen sind die molekularen Kaskaden, Expression und Prozessierung von Transkriptionsfaktoren und unmittelbar frühen Genen anfällig für Störungen, welche durch Medikamente, Antikörper und physische Traumata zu einer Inhibition der Gedächtniskonsolidierung führen können. Bereits sechs Stunden nach dem Training werden Erinnerungen unempfindlich gegenüber Störungen, die die synaptische Konsolidierung und die Bildung des Langzeitgedächtnisses stören könnten (Dudai, 2004).

In neueren Studien wird vermutet, dass die synaptische Konsolidierung einen Unterprozess der systemischen Konsolidierung darstellt, da während der systemischen Konsolidierung immer wieder synaptische Prozesse ablaufen (Dudai et al., 2015). Das Standardmodell der Systemkonsolidierung wurde von Squire und Alvarez zusammengefasst (Squire & Alvarez, 1995). Das Modell postuliert, dass der Hippocampus als Teil des medialen Temporallappens gemeinsam mit dem entorhinalen Kortex eine zeitlich begrenzte Rolle bei der Aufbewahrung von Langzeitgedächtnisinhalten spielt und dass eine sogenannte permanente Gedächtnisspur hin zum Neokortex angelegt wird. Dieser Reorganisationsprozess bewirkt, dass Hippocampus-abhängige Erinnerungen Hippocampus-unabhängig werden (Dudai, 2004), das heißt, Erinnerungen aus dem Hippocampus werden in einer dauerhafteren Form der Speicherung in den Neocortex verschoben (Roediger et al., 2007). Eine wiederholte Reaktivierung dieses Netzwerkes zwischen Hippocampus bzw. dem medialen Temporallappen und dem Neokortex führt zu einer Veränderung des neokortikalen Gedächtnisnetzwerkes, das heißt, bestehende Verbindungen können verstärkt und neue Verbindungen können angelegt werden. Während der Aufbau dieser Verbindungen als relativ schneller Prozess vonstattengeht und die Veränderungen sehr kurzlebig sind, so finden Veränderungen des neokortikalen Netzwerkes nur sehr langsam statt; dafür sind sie umso stabiler. Die systemische Konsolidierung ist somit ein langsamer dynamischer Prozess und kann Wochen bis Jahrzehnte in Anspruch nehmen.

1.3.3 Neuronale Plastizität

Die neuronale Plastizität bildet die Basis für die Entwicklung und Dynamik des Gehirns und beschreibt die Veränderung vorhandener Nervenzellen und Synapsen in Abhängigkeit ihrer Aktivierung. Sie wird als der zelluläre Mechanismus verstanden, der den physiologischen Prozessen des Lernens und des Gedächtnisses zugrunde liegt (Martin et al., 2000).

Es werden zwei Arten neuronaler Plastizität beschrieben, die Kurzzeit- und die Langzeitplastizität. Die Kurzzeitplastizität moduliert die Stärke von Synapsen in Millisekunden bis Minuten, indem eine Änderung der präsynaptischen

Calciumkonzentration eine Verstärkung oder Verringerung der synaptischen Übertragung bewirkt (Zucker & Regehr, 2002). Langfristigere Änderungen der Synapsenstärke hingegen werden durch einen Calciumeinstrom in postsynaptische Neuronen vermittelt. Die Langzeitplastizität beschreibt Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke in Stunden und mehreren Tagen und bildet dadurch die Basis für Lernen und Gedächtnis. Weiterhin kann die neuronale Plastizität sowohl prä- als auch postsynaptisch verursacht sein, wobei beide Änderungen gleichzeitig vorkommen können. Präsynaptisch ändert sich dafür die Menge des pro Aktionspotential freigesetzten Neurotransmitters oder die Geschwindigkeit der Wiederaufnahme des Neurotransmitters in die präsynaptische Zelle, während sich auf postsynaptischer Seite die Größe der postsynaptischen Antwort auf eine bestimmte Menge von Transmitter ändert. Dies geschieht beispielsweise durch eine Veränderung in der Anzahl postsynaptischer Transmitter-Rezeptoren, durch die Modifikation dieser Transmitter-Rezeptoren via Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, oder durch die Bildung von Enzymen, die das Verhalten der Neurotransmitter im synaptischen Spalt verändern.

Die neuronale Plastizität spielt eine Schlüsselrolle in der frühen Entwicklung neuronaler Schaltkreise, und Beeinträchtigungen synaptischer Plastizitätsmechanismen können Grundlage für neuropsychiatrische Erkrankungen sein (Citri & Malenka, 2008).

1.3.4 Hippocampus

Der Hippocampus ist eine paarige, phylogenetisch sehr alte Struktur des Schläfenlappens, dessen Name auf die Ähnlichkeit zwischen dem strukturellen Querschnitt und einem Seepferdchen (griechisch ‚Hippokampus‘) zurückzuführen ist. Dieser Teil des medialen Schläfenlappens enthält sensorische Informationen und steuert sowohl deren Speicherung als auch deren Abruf (Lavenex & Amaral, 2000). Zu der Hippocampusformation zählt man die drei Strukturen Gyrus dentatus, Cornu Ammonis (Ammonshorn, CA) und Subiculum. Der Gyrus dentatus besteht aus der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und der innen liegenden polymorphen Zellschicht, welche auch als Hilus bezeichnet wird. Die Zellschichten CA heißen (von außen nach innen) Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum lucidum, Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare. Histologisch zeigt sich die archicorticale Dreischichtung, in der die Pyramidenzellkörper in dem mittleren Stratum pyramidale liegen und von dort Dendriten in das Stratum oriens sowie das Stratum radiatum und lacunosum-moleculare ausbilden. Das Subiculum zeigt einen dreischichtigen Aufbau, der ein Übergangsfeld vom dreischichtigen Hippocampus zum sechsschichtigen Neokortex darstellt.

In der Hippocampusformation sind die erregenden Neuronen in einer Kette hintereinandergeschaltet. Die Fasern des Tractus perforans aus dem entorhinalen Kortex enden an den Körnerzellen des Gyrus dentatus und bilden dabei die Hauptafferenzen des

Hippocampus. Die Körnerzellen entsenden die sogenannten Moosfasern, die zu den Pyramidenzellen des CA, genauer gesagt der CA3 Region, führen. Dort haben die Schaffer'schen Kollateralen ihren Ursprung und projizieren zu den Pyramidenzellen der CA1 Region. Zusätzlich erhalten CA1-Neurone direkte Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex. Efferenzen gelangen in das Subiculum und bilden dabei eine wichtige Verbindung des Hippocampus über den Fornix zum „limbischen System“ (D. Amaral & Lavenex, 2007). Verschiedene Erkrankungen können zu einer Veränderung des Hippocampus führen. So spielt der Hippocampus beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Epilepsieerkrankungen; eine chirurgische einseitige Entfernung der Hippocampusformation stellt dabei eine mögliche Behandlung von medikamentös unbeherrschbaren Anfällen dar. Darüber hinaus können Abbauprozesse bei Demenzerkrankungen die hippocampale Struktur derart schädigen, dass es zum Gedächtnisverlust bei Patienten kommt.

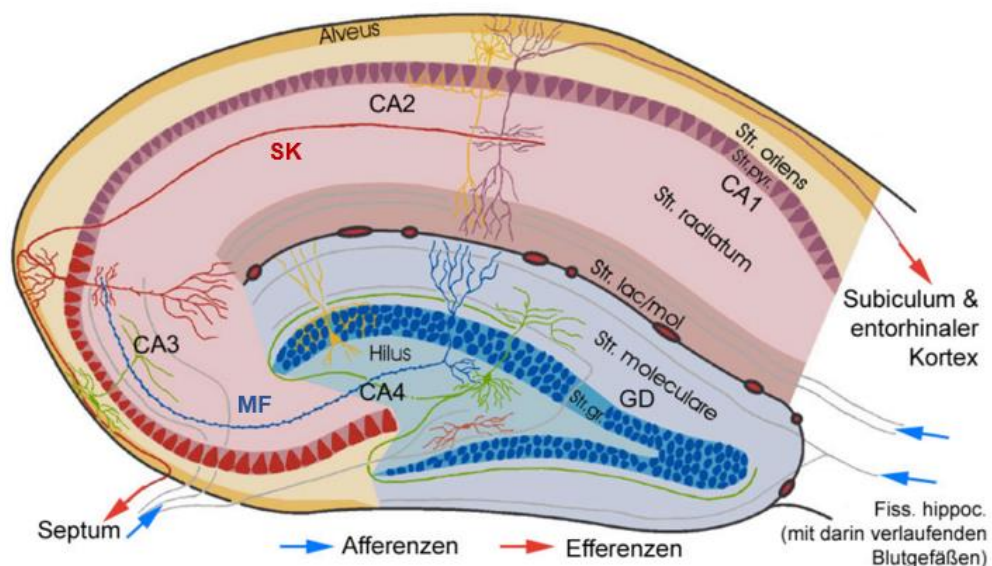


Abbildung 8: Koronarschnitt durch die Hippocampusformation. Gezeigt sind das Ammonshorn (gelb und violett), der Gyrus dentatus (blau) sowie afferente und efferente Verbindungswege (blaue und rote Pfeile). CA1-CA4: Cornu ammonis Regionen; GD: Gyrus dentatus; MF: Moosfasern; SK: Schaffer Kollaterale (modifiziert nach J. Kacza, Veterinär-Anatomisches Institut Leipzig).

1.4 Autismus

1.4.1 Epidemiologie und Klinik

Nach aktueller Definition ist Autismus kein einheitliches Krankheitsbild, sondern aufgrund der variablen klinischen Ausprägung Teil der Autismus-Spektrum-Störungen (ASS). Dabei handelt es sich um eine tiefgreifende Entwicklungsstörung, die durch eine

Minderung der sozialen Interaktion und Kommunikation sowie durch repetitive stereotype Verhaltensmuster und Aktivitäten gekennzeichnet ist (Kanner, 1943). Mit einer Prävalenz von bis zu 1% gehören sie zu den eher seltenen Störungen im Kindes- und Jugendalter, wobei Jungen viermal häufiger als Mädchen erkranken. Das Störungsbild ist sehr heterogen und durch eine stark beeinträchtigte Symptomatik gekennzeichnet, die in der Regel vor dem dritten Lebensjahr auftritt und über die Lebensspanne persistiert. 70% der Patienten haben zusätzlich eine Intelligenzminderung, circa 25% leiden zusätzlich zu ASS noch an Epilepsie (Zoghbi & Bear, 2012). Dadurch wird deutlich, dass ASS selten isoliert, sondern meist einhergehend mit anderen somatischen oder psychiatrischen Erkrankungen auftritt. Weitere Komorbiditäten sind ADHS, Schlafstörungen und Angststörungen (Gail Williams et al., 2004; Huguet et al., 2013; VOLKMAR & NELSON, 1990).

Im derzeit gültigen Klassifikationssystem ICD-10 wird zwischen verschiedenen Autismusformen unterschieden; dazu gehören der frühkindliche und der atypische Autismus sowie auch das Asperger-Syndrom. Die ICD-11 (gültig ab 2022) enthält hingegen keine Subtypen mehr, es wird nur noch von einer allgemeinen Autismus-Spektrum-Störung gesprochen. Grund für die Änderung in der ICD Kodierung ist die Erkenntnis aus dem wissenschaftlichen Fortschritt, dass eine klare Abgrenzung der Subtypen nicht möglich ist und man von einem Übergang zwischen milden und stärkeren Formen ausgehen sollte (<http://id.who.int/icd/entity/437815624>, Stand: 22.01.2022). Ebenso vielfältig wie die klinischen Ausprägungen von ASS sind deren mögliche Ursachen. Dazu zählen einerseits Umweltfaktoren und andererseits genetische Veränderungen (Kleijer et al., 2014).

1.4.2 Genetische und neuroanatomische Ursachen von Autismus-Spektrum-Störungen

In etwa 20-25% der Fälle kann ASS auf genetische Veränderungen zurückgeführt werden. Davon treten circa 80% sporadisch durch *de novo* Mutationen auf (Kleijer et al., 2014). Bis zu 200 Gene sind eindeutig „Autismogene“, bis zu 1000 Gene können darüber hinaus mit ASS assoziiert werden (Huguet et al., 2013; Satterstrom et al., 2020). Genetische Risikofaktoren lassen sich dahingehend in mindestens vier Gruppen unterteilen: syndromale ASS, Chromosomenaberrationen, seltene Copy Number Variations (CNVs) und seltene hoch-penetrante monogenetische Mutationen (Devlin & Scherer, 2012). Zu den syndromalen Formen der ASS zählen unter anderem das Fragile-X-Syndrom, das Rett-Syndrom, die Tuberöse Sklerose, das PTEN-Hamman-Richards-Tumor-Syndrom, das Phelan-McDermid-Syndrom, die Neurofibromatose und das Angelman-Syndrom (Zoghbi & Bear, 2012). Seltene chromosomale Aberrationen sind bei circa 5% ursächlich für die genetische ASS. Dabei ist mit einem Anteil von 1-3% die Duplikation von 15q11-q13 die häufigste Aberration, welche dem Angelmann-/Prader-Willi-

Syndrom zugrunde liegt. Zusätzlich können auch die Trisomie 21 sowie das Turner-Syndrom zu autistischen Phänotypen führen (Betancur, 2011; Devlin & Scherer, 2012). Kopplungsstudien und Screening-Experimente konnten Mutationen in bestimmten Genen identifizieren, die verantwortlich für ASS sind und der Gruppe der hoch-penetranten monogenetischen Mutationen zuzuordnen sind. Dazu zählen unter anderem *Neurologin 3* (NLGN3) und *Neurologin 4* (NLGN4) auf dem X-Chromosom, *Neurexin 1* (NRXN1) auf Chromosom 2p16, *PROSAP3/SHANK1* auf Chromosom 19q13.3, *PROSAP1/SHANK2* auf Chromosom 11q13.2, *PROSAP2/SHANK3* auf Chromosom 22q13.3 sowie Contactin associated Protein-like 2 (CNTNAP2) auf Chromosom 7q35 (Alarcón et al., 2008; J. Feng et al., 2006; Jamain et al., 2003; Tromp et al., 2020).

Dabei kann man zwei Gruppen von neuronalen Funktionen erkennen, mit denen viele mutierte Gene assoziiert sein können. Die eine Gruppe umfasst Mutationen, die den mTOR/PI3K-Signalweg beeinflussen und zu veränderten neuronalen Wachstumsraten führen, wie beispielsweise die Neurofibromatose oder die Tuberöse Sklerose. Zu der anderen Gruppe werden Mutationen in den Neurologin- oder SHANK-Genen gezählt, die Einfluss auf die synaptische Funktion, Synaptogenese und die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Eingängen (E/I-Balance) zum Neuron ausüben (Bourgeron, 2009). Die Tatsache, dass 10-30% der ASS-Patienten eine Makrocephalie und auch ein erhöhtes Hirnvolumen aufweisen, spricht für die Theorie des vermehrten Neuronenwachstums über einen gestörten mTOR-Signalweg (D. G. Amaral et al., 2008), wohingegen der Fakt, dass ungefähr ein Viertel der ASS-Patienten zusätzlich an Epilepsie leidet, für eine gestörte E/I-Balance spricht (Canitano, 2007). Systematische postmortale Untersuchungen an autistischen Patienten konnten einige neuroanatomische Veränderungen aufzeigen. So konnte im Rahmen der ersten Untersuchungen festgestellt werden, dass der Kortex eine Auffälligkeit im Sinne eines ungewöhnlich grobkörnigen Gyrus Cinguli – eine Hirnregion, welche in Impulskontrolle und emotionale Prozesse sowie auch komplexe Problemlösungen involviert ist – mit einer verminderten Ausbildung der Laminae aufweist (Kemper & Bauman, 1993). Diese Veränderungen können mit repetitiven Verhaltensweisen und auch mit gestörter sozialer Interaktion in Verbindung gebracht werden. Weiterhin konnte bei Patienten eine Zunahme des kortikalen Durchmessers, der Neuronendichte sowie eine ungewöhnliche kortikale Laminierung nachgewiesen werden (Bailey, 1998). Bei Kindern und Jugendlichen konnte eine vergrößerte Amygdala festgestellt werden, was mit erhöhter Ängstlichkeit assoziiert werden kann (Juraneck et al., 2006). Beschriebene Veränderungen im Kleinhirn könnten motorische Einschränkungen erklären.

1.4.3 Neurologine und Autismus-Spektrum-Störungen

In all diesen gelisteten Hirnregionen werden beispielsweise SHANK Proteine teilweise stark exprimiert, wodurch vermutet werden kann, dass eine Fehlfunktion unter anderem

dieser Proteine ursächlich für ASS sein kann. Zusätzlich zu den SHANK-Proteinen gelten auch die Neuroligin- sowie Neurexin-Gene schon seit vielen Jahren als Hauptverdächtige in der Autismusforschung. Ein Funktionsverlust von Neuroliginen und Proteinen, die mit Neuroliginen intrazelluläre und transsynaptische Komplexe bilden, gelten als Risikofaktoren für ASS.

Neuroligine sind vorwiegend postsynaptisch lokalisierte Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domänen sich unter anderem mit den präsynaptisch lokalisierten Neurexinen verbinden. Die transsynaptischen Neuroligin-Neurexin-Komplexe regulieren durch die Rekrutierung von prä- und postsynaptischen Proteinen die Funktion, Spezifikation und Plastizität von Synapsen (Südhof, 2008a). Säugetiere besitzen in der Regel vier Neuroligin- und drei Neurexin-Gene, die für jeweils mehrere alternativ gespleißte Proteine codieren, welche wiederum in unterschiedlichen Kombinationen an bestimmten Synapsentypen lokalisiert sind. Neuroligin-1 ist überwiegend an glutamatergen erregenden Synapsen lokalisiert. Über die Bindung an das Strukturprotein PSD-95 führt es zur Akkumulation von AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Neuroligin-2 ist selektiv an inhibitorischen GABAergen und glycinergen Synapsen exprimiert, wo es unter anderem mit dem Strukturprotein Gephyrin assoziiert und ionotrope GABA-beziehungsweise Glycin-Rezeptoren rekrutiert. Neuroligin-3 und -4 finden sich sowohl an erregenden als auch an hemmenden Synapsen. Dabei präferiert Neuroligin-3 GABAerge und Neuroligin-4 glycinerge inhibitorische Synapsen. Neuroligine und Neurexine gelten als wichtige Regulatoren für die Spezifikation, den Erhalt und die Plastizität synaptischer Kontakte (Craig & Kang, 2007). Diese Wechselwirkungen von Neuroligin, Neurexin und interagierenden Proteinen wie PSD-95 deuten auf einen möglichen Regulationsmechanismus hin, der die Entwicklung und das Gleichgewicht von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen steuert und durch homöostatische Rückkopplungsmechanismen beeinflusst wird (Levinson & El-Husseini, 2005). Studien an Mäusen konnten eine Störung der E-/I-Balance durch einen Funktionsverlust bestimmter Neuroligine nachweisen (Chih et al., 2005; Levinson & El-Husseini, 2005). Dabei kann der Funktionsverlust eines bestimmten Neuroligins in verschiedenen Hirnregionen und an unterschiedlichen Synapsen desselben Neurons zu gegensätzlichen Effekten auf die Aktivität des neuronalen Netzwerks führen (Etherton et al., 2011).

Neueste Forschungsergebnisse aus dem Labor von Peter Scheiffele konnten unter Verwendung eines Mausmodells eine Verbindung zwischen dem Neuroligin-3-Gen und dem Oxytocin Signalweg aufdecken (Hörnberg et al., 2020). Das Hormon Oxytocin steuert bei Säugetieren das Sozialverhalten, welches sich als eine verminderte soziale Interaktion in den veränderten Mäusen widerspiegelte. Ursächlich dafür ist, dass der Verlust von Neuroligin-3 das Gleichgewicht der Proteinproduktion in den Neuronen stört, was die Reaktion der Nervenzellen auf Oxytocin verändert. Dies konnte durch die

Behandlung mit einem Hemmstoff der Proteinsynthese wieder behoben werden, die Veränderungen im Oxytocin-Signalweg scheinen reversibel.

1.5 Forschungsfrage und Zielsetzung

Eine Dysregulation des mTOR-Signalweges gilt als die Hauptursache für verschiedene neurologische Störungen, wie beispielsweise Autismus-Spektrum-Störung oder Intelligenzminderung. Jedoch sind die Folgen von mTOR-Funktionsstörungen auf molekularer und zellulärer Ebene kaum bekannt und können aufgrund seiner Schlüsselfunktion innerhalb verschiedenster metabolischer und neurologischer Prozesse sehr vielfältig sein. Die Identifizierung der Mechanismen und Zusammenhänge ist jedoch bedeutsam, um die Pathogenese neuronaler Entwicklungsstörungen zu verstehen, neue mögliche Therapieansätze zu identifizieren und dadurch den Leidensdruck betroffener Patienten und deren Angehöriger zu minimieren.

Mutationen in einzelnen Genen – so genannte monogene Erkrankungen – können zu syndromalen Formen von Autismus und Intelligenzminderung führen. Je nach dem betroffenen Gen und der individuellen Kompensationsfähigkeit ist die klinische Variabilität meist hoch und nicht alle Patienten zeigen das volle Spektrum der Symptome. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konventionelles Mausmodell für Tuberöse Sklerose (TS) verwendet, um die molekularen Mechanismen einer mTOR Dysregulation longitudinal über einen längeren Zeitraum und deren Bedeutung für die Entstehung von ASS und Intelligenzminderung zu untersuchen. Das Verständnis der zeitlichen Zusammenhänge einer mTOR Dysregulation soll die Entwicklung neuer Therapieansätze für TS und womöglich auch andere, mit ähnlichen Symptomen assoziierte monogene Erkrankungen ermöglichen. Die TS ist eine Multisystemerkrankung, die durch gutartige Tumore und fokale Dysplasie in mehreren Organen, wie beispielweise Haut und Gehirn, gekennzeichnet ist. Sie geht weiterhin mit einer Funktionsstörung des Gehirns einher, welche Intelligenzminderung und Autismus einschließt. Im Speziellen wurde entsprechend dem Phänotyp der humanen Tuberösen Sklerose, der sich sequentiell entwickelt und sowohl Autismus als auch Intelligenzminderung umfasst, ein konstitutives heterozygotes *Tsc2*^{+/-} -Mausmodell gewählt, welches im ersten Teil der vorliegenden Arbeit longitudinal analysiert werden sollte. Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass sich der autistische Phänotyp früher als der kognitive Phänotyp entwickelt – hier galt es, diese Ergebnisse zu reproduzieren, vertiefter zu charakterisieren und Zeitpunkte zu definieren, an denen die einzelnen Verhaltensauffälligkeiten erstmalig auftreten. Diese longitudinalen Verhaltensstudien waren dann die Grundlage für weitere molekulare Analysen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten anhand dieser Längsschnittanalyse Zeitpunkte in der Entwicklung definiert werden, an denen molekulare, biochemische und anatomische

Untersuchungen durchgeführt werden sollen, um die dem Autismus sowie auch der geistigen Behinderung zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären. Dabei sollte einerseits ein Fokus auf die frühe Gehirnentwicklung gelegt werden, während derer molekulare Veränderungen als Folge des primären Gendefekts zu vermuten sind. Außerdem sollte andererseits die Phase nach Abschluss der Gehirnentwicklung untersucht werden, in der Störungen sekundär als Folge einer veränderten Hirnfunktion oder einer gestörten Homöostase zu erwarten sind.

Um die molekularen Ursachen der autistischen Verhaltensdefizite, welche bereits in jüngeren Tieren erstmalig auftreten, aufzuklären, wurde eine vergleichende Proteomanalyse von kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu verschiedenen Zeitpunkten von der frühen bis zur späten postnatalen Entwicklung mittels serieller Western-Blot- und Massenspektrometrie-Analyse durchgeführt. Fokussiert wurde sich hierbei auf mTOR-regulierte sowie synaptische Proteine. Diese Analyse sollte Aufschluss über die Komposition und hypothetische Fehlregulation wichtiger synaptischer Rezeptoren bzw. Proteine geben, welche das homöostatische System in Ungleichgewicht bringen und ursächlich für die Ausbildung autistischer Verhaltensweisen sein könnten. Dadurch sollten vulnerable Fenster definiert werden, innerhalb derer eine mögliche Therapie sinnvoll sein könnte, um der Krankheitsentwicklung vorzubeugen.

Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, ob die kognitiven Defizite in alten heterozygoten *Tsc2*-Tieren einem neurodegenerativen Prozess zugrunde liegen oder sogar anatomische Abnormalitäten im Hippocampus ursächlich sein könnten. Weiterhin sollten auch in den alten Tieren vergleichende Studien von hippocampalen Homogenaten und Synaptosomen auf Proteinebene Aufschluss über mögliche zugrunde liegende Fehlregulationen geben.

Schlussendlich sollte, basierend auf den erhobenen Daten, ein Therapieansatz zu entwickelt werden, der die kognitiven Einschränkungen in den heterozygoten alten Tieren mildern oder sogar auf Normalniveau zurückbringen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte und ihre Hersteller

Gerät	Hersteller
Analysewaage LA 230S	Satorius AG
Cell incubator CO2 Incubators CB 210	Binder
ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad
Electrophoresis Power Supply	Peqlab
HeraSafe Sterilbank	Heraeus
Homogenisierer Pellet Pestle Cordless Motor	Kortez
Inkubationsschüttler Polymax 1040	Heidolph
Laser-Scanning Mikroskop TCS SPE	Leica
Luminometer, Infinite M200	Tecan
Mikroskop EVOS XL	Life Technologies
Mikroskop Zeiss Axiovert25	Carl Zeiss
Mini Protean Tetra Cell	Biorad
Nanodrop™ Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop
pH-Messgerät Satorius pH Meter PB-11	Satorius AG
Rollenmischer Roller Mixer SRT9D	Stuart
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermocycler MJ Research PTC-200	Biorad
TransBlot Turbo Transfer System	Biorad
Ultrazentrifuge Optima™ L-80 XP	Beckman Coulter
UV-Transilluminator Intas Gel iX Imager	Intas-Science-Imaging Instruments GmbH
Zentrifuge Megafuge 16R	Heraeus

Zentrifuge Peqlab PerfectSpin 24R	Peqlab
--	--------

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien/ Reagenzien und ihre Hersteller

Name	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth
Agarose	AppliChem
APS	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth
BSA	Carl Roth
CaCl₂	Carl Roth
EDTA	AppliChem
Ethanol (100%)	AppliChem
Ethanol vergällt	VWR International
Ethidiumbromid	Carl Roth
GeneRuler 100bp	Thermo Scientific
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Na₂HPO₄	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
Paraformaldehyd	Roth
PhosStop	Roche
Proteaseinhibitor	Roche
Proteinase K	AppliChem
SDS	Carl Roth

Syn-Per™ Synaptic Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific
TEMED	Invitrogen
Tris	Carl Roth
Trizol	Invitrogen
Tween20	Carl Roth
Vectashield	Vector Laboratories
β-mercaptoethanol	Carl Roth

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer/ Lösungen und ihre Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
0,5 M Tris pH 6,8	30,275 g Trisbase 400 ml ddH ₂ O konzentriertes HCl zum pH-Wert einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml
1 M Sucrose	1 M Sucrose 5 mM TRIS/ HCl pH 8,1 ddH ₂ O
1,2 M Sucrose	1,2 M Sucrose 5 mM TRIS/ HCl pH 8,1 ddH ₂ O
1,5 M Tris pH 8,8	90,825 g Trisbase 400 ml ddH ₂ O konzentriertes HCl zum pH-Wert einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml
10 % SDS	10 g SDS 90 ml ddH ₂ O
10% APS	1 g Ammonium persulfate 10 ml ddH ₂ O

2x Magic Mix	<p>48 % Harnstoff 14 mM Tris pH 7,5 8,7% Glycerin 1 % SDS 1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette ddH₂O</p>
Agarosegel-Lösung	<p>6 g Agarose 200 ml 1 x TAE Puffer</p>
Laemmli-Puffer	<p>2x MagicMix 0,004% Bromphenolblau</p>
PBS-T	<p>1 ml Tween 2 PBS-Tabletten auf 1 Liter ddH₂O</p>
Proteinase K	<p>200 mg in 10 ml lösen</p>
Puffer A	<p>0,32 M Sucrose 5 mM HEPES Puffer pH 7,4 Complete™ Protease Inhibitor ddH₂O</p>
SDS Laufpuffer	<p>3 g Tris Base, 14,4 g Glycin, 1 g Natriumdodecylsulfat in 1 L ddH₂O</p>
TAE Puffer (50x)	<p>242 g TRIS 18,6 g EDTA 57,1 ml Essigsäure (100%) auf 1 l ddH₂O</p>

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits und ihre Hersteller

Name	Hersteller	Bestellnummer
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche	11732676001
High Pure RNA Isolation Kit	Roche	11828665001
QIAshredder	Qiagen	
Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer	NEL 103001EA

2.1.5 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primersequenzen

Name	Sequenz
DNA	
<i>Tsc2_Genotyping_1</i>	CAAACCCACCTCCTCAAGCTTC
<i>Tsc2_Genotyping_2</i>	AATGCGGCCTCAACAATCG
<i>Tsc2_Genotyping_3</i>	AGACTGCCTTGGGAAAAGCG
qPCR	
<i>qPCR_cFos_f</i>	GGGCTGCACTACTTACACGT
<i>qPCR_cFos_r</i>	TGCCTTGCCTTCTCTGACTG
<i>qPCR_Zif268_f</i>	ATGAGAAGGCGATGGTGGAG
<i>qPCR_Zif268_r</i>	CTCACGAGGCCACTGACTAG
<i>GAPDH-ms-qPCR-for</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
<i>GAPDH-ms-qPCR-rev</i>	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete primäre Antikörper, deren Hersteller und Bestellnummer

Protein	Hersteller	Bestellnummer
Actin	Sigma-Aldrich	A2066-200UL
Akt	Cell Signaling	9272
GABA A alpha1	abcam	ab33299
GABA B R1	abcam	ab55051
GABA B R2	Cell Signaling	4819
GluN2a	Cell Signaling	4305
GluR1	Cell Signaling	13185
GluR2	Cell Signaling	13607
Neurexin 1	Synaptic Systems	175 103
Neuroigin 2	Synaptic Systems	129 511
Neuroigin 3	Synaptic Systems	129 311
pAkt	Cell Signaling	9271
pS6	Cell Signaling	2215
S6	Cell Signaling	2317
Tsc2	Cell Signaling	4308

Tabelle 8: Verwendete sekundäre Antikörper, deren Hersteller und Bestellnummer

Name	Hersteller	Bestellnummer
AffiniPure Goat anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
AffiniPure Goat anti-Hase IgG	Jackson ImmunoResearch	111-005-003

2.1.7 EDV Programme

Tabelle 9: Verwendete EDV-Programme und ihre Entwickler

Name	Hersteller
Coral Draw	Corel Corporation
EthoVision XT 8.5	Noldus
Fiji ImageJ	Fiji ImageJ
Image Lab	Bio-Rad
Imaris 8	Oxford Instruments
Las X Life Science	Leica
Office	Microsoft
Prism	GraphPad
STRING 11.0	European Molecular Biology Laboratory

2.1.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Excel und der GraphPad PRISM Software durchgeführt. Wegen der teilweise niedrigen Probenanzahl wurde für alle Westernblotanalysen Normalverteilung angenommen. Die Auswertung aller Westernblotanalysen erfolgte anschließend unter Verwendung des Zweistichproben-t-Tests. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Auswertung mittels nicht-parametrischer Tests (Mann-Whitney-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test). Ein p-Wert <0,05 verwirft die Nullhypothese H₀ (H₀: kein Gruppenunterschied). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Als Darstellung des statistischen Fehlers wurde der Standardfehler angegeben, Ausnahmen wurden in den Abbildungslegenden beschrieben.

2.2 Methoden

Alle Experimente wurden gewissenhaft und unter Achtung der guten Laborpraxis durchgeführt.

2.2.1 *In vivo* Experimente mit *Tsc2*^{+/-} Mäusen

Die Zucht und Haltung der Tiere sowie das gesamte experimentelle Vorgehen wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des Translational Animal Research Center (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Dr. Jan Baumgart durchgeführt. Die TARC ist eine Einrichtung 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 *Maus Behavior Unit* (MBU) überführt. Das Versuchsvorhaben mit der *Tsc2*-KO-Mauslinie wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter dem Aktenzeichen G15-1-068 genehmigt.

2.2.1.1 *Tsc2*^{+/-}-KO Mauslinie

Beim B6;129S4-*Tsc2*^{tmDjk/J} Stamm handelt es sich um eine belastete, murine *Tsc2*-Knockoutlinie, die kommerziell erworben wurde (The Jackson Laboratory, Stammmnummer 004686). Exon 2 des Gens *tuberous sclerosis complex 2* (*Tsc2*) wurde durch eine Neomycinkassette ersetzt, wodurch die Genexpression aufgehoben wurde. Ein Zielvektor, der Neomycinresistenz- sowie Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gene enthielt, wurde verwendet, um das Exon 2 des *Tsc2*-Locus auf Chromosom 17 zu zerstören. Das Konstrukt wurde in 129S4/SvJae-abgeleitete J1-embryonale Stammzellen (ES) elektroporiert. Korrekt zielgerichtete ES-Zellen wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Die resultierenden chimären Tiere wurden mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt. Heterozygote Tiere wurden dann untereinander gekreuzt. Heterozygote (*Tsc2*^{+/-}) Mäuse sind lebensfähig, fertil, normalgroß und weisen keine physischen Einschränkungen oder Verhaltensauffälligkeiten auf (Onda et al., 1999). Alle heterozygoten Mäuse entwickeln vielfältige bilaterale Zystadenome der Nieren im Alter von 12-15 Monaten. Etwa 50% der heterozygoten Tiere entwickeln zudem Hemangiome der Leber und bei weniger als 10% entstehen Angiosarkome der Extremitäten oder Karzinome der Nieren im Alter von 15 Monaten. Homozygote (*Tsc2*^{-/-}) Mäuse haben einen embryonal letalen Phänotyp, da sie sich aufgrund einer Leberhyperplasie nicht über den embryonalen Tag 9,5 bis 12,5 hinausentwickeln (Onda et al., 1999).

2.2.1.2 Mausezucht

Für die beschriebenen Verhaltensstudien wurden nur männliche Tiere verwendet, um eine Variabilität im Verhalten gering zu halten, da bei Weibchen bedingt durch ihren Östruszyklus eine höhere Varianz entstehen kann (Gray & Cooney, 1982) (Walf et al., 2009). *Tsc2*^{+/-}-Männchen resultierten aus der Verpaarung eines Zuchtpaares mit den Genotypen *Tsc2*^{+/-} und *Tsc2*^{+/-} oder *Tsc2*^{+/-} und *Tsc2*^{+/+} (Tabelle 10). Wildtypische Geschwistertiere dienten als Kontrolltiere. Zur Genotypisierung wurden Schwanzbiopsien beziehungsweise Ohrstanzen entnommen, aus denen genomische DNA extrahiert wurde. Das Management der Zucht erfolgte durch die Tierpfleger der TARC.

Tabelle 10: Kreuzungsschema 1 der *Tsc2*^{+/-} -Mauslinie

Kreuzung <i>Tsc2</i>^{+/-} x <i>Tsc2</i>^{+/-}	
25% <i>Tsc2</i> ^{-/-}	embryonal letal
25% <i>Tsc2</i> ^{+/-}	gewünschter Genotyp für Verhaltensstudien
25% <i>Tsc2</i> ^{+/+}	Kontrolltiere für Verhaltensstudien

Kreuzung <i>Tsc2</i>^{+/-} x <i>Tsc2</i>^{+/+}	
50% <i>Tsc2</i> ^{+/-}	gewünschter Genotyp für Verhaltensstudien
50% <i>Tsc2</i> ^{+/+}	Kontrolltiere für Verhaltensstudien

2.2.1.3 Genotypisierung

Zur genotypischen Bestimmung wurden den Tieren im Alter von 2 Wochen Schwanzbiopsien bzw. im Alter von 3 Wochen nach Absetzen im Rahmen der Ohrmarkierung Ohrbiopsien entnommen, um im nächsten Schritt genomische DNA zu isolieren. Zum Verdau wurde das Gewebe mit 180 µl Verdaupuffer (Tabelle 11) sowie 20 µl Proteinase K zur enzymatischen Aufspaltung für mindestens drei Stunden oder über Nacht bei 56°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand 1:3 mit ddH₂O verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde 1 µl für die Standard-PCR eingesetzt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Verdaupuffers zur Genotypisierung.

Komponente	Menge
ddH ₂ O	20,54 ml
1 M NaCl	6 ml

1 M TRIS (pH 8)	3 ml
0,5 M EDTA	400 μ l
10% SDS	60 μ l

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction/ kurz: PCR) ist eine enzymatisch gesteuerte Reaktion, um definierte Sequenzen genomischer DNA mittels spezifischer Primer zu vervielfältigen. Im Rahmen der Genotypisierung wurden Reaktionsansätze bestehend aus FastStart-Taq Polymerase, 10x PCR-Puffer + $MgCl_2$, dNTPs, spezifischen Primern und ddH_2O vorbereitet (Tabelle 12). Dazu wurden die Primer *Tsc2_Genotyping_1*- CAAACCCACCTCCTCAAGCTTC, *Tsc2_Genotyping_2*- AATGCGGCCTCAACAATCG und *Tsc2_Genotyping_3*- AGACTGCCTTGGGAAAAGCG in Anlehnung an Onda et al. 1999 (Abb. 9) verwendet.

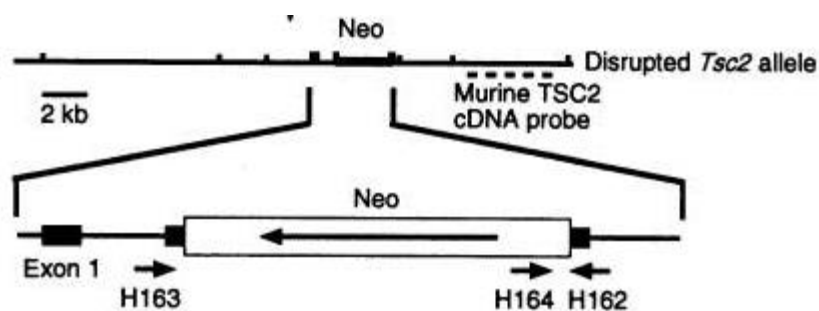


Abbildung 9: Primer-Strategie zur *Tsc2* Genotypisierung (Onda et al. 1999) .

Tabelle 12: Mastermix für Genotypierungs-PCR

Komponente	Menge [μ l]
ddH_2O	16,6
10x PCR-Puffer + $MgCl_2$	2,5
Primer <i>Tsc2_Genotyping_1</i>	2
Primer <i>Tsc2_Genotyping_2</i>	1
Primer <i>Tsc2_Genotyping_3</i>	1
dNTPs (25mM)	0,5
FastStart Taq Polymerase	0,4
DNA	1

Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung des Programms „*Tsc2*-Genotyping“ (Tabelle 13).

Tabelle 13: Thermocyclerprogramm „*Tsc2*-Genotyping“ für Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1. Denaturierung	94	3 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Annealing	62	30 sec
4. Elongation	72	30 sec
5. Loop	Zurück zu Schritt 2	35 x
6. Elongation	72	10 min
7. Lagerung	4	∞

Anschließend wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch auf einem 3%igen Agarosegel großzügig aufgetrennt, um die *mut-Tsc2*-Bande von der *wt-Tsc2*-Bande zu trennen, und unter einem Gel iX Imager ausgewertet. Bei allen Proben wurde eine *wt-Tsc2*-Bande bei 86 bp, bei den heterozygoten Mäusen eine zusätzliche *mut-Tsc2*-Bande bei 105 bp erwartet (Abb. 10).

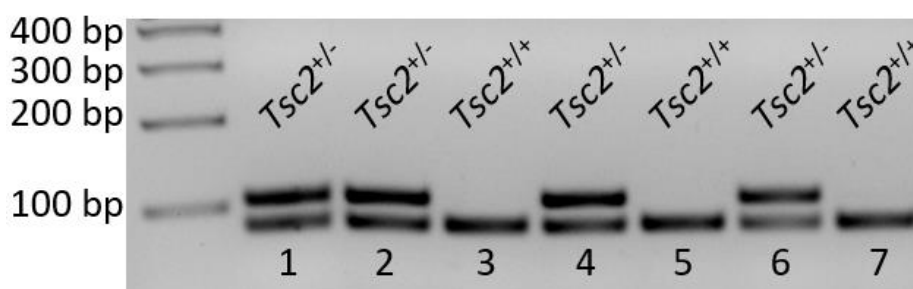


Abbildung 10: Exemplarische Genotypisierung nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte. Zwei Banden zeigen die PCR Produkte eines heterozygoten Tiers (Bande 1, 2, 4, 6) wobei die niedrigere Bande bei 86 bp die *wt-Tsc2*-Bande und die größere Bande bei 105 bp die *mut-Tsc2*-Bande zeigt. Ist nur eine Bande sichtbar, handelt es sich um ein wildtypisches Tier (3, 5, 7).

2.2.1.4 Verhaltensexperimente

Die in den Verhaltensexperimenten verwendeten Mäuse wurden stets mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn aus dem spezifisch pathogen freien (SPF)- Bereich in die MBU überführt. Vor jedem erstmaligen Versuchsvorhaben wurde jedes einzelne Tier dem sogenannten Handling unterzogen. Hierbei handelt es sich um eine generelle Habituationsphase, innerhalb derer die Tiere an den Versuchsdurchführer sowie das Umsetzen von Haltungskäfig in Zwischenbox bzw. Versuchsaufbau gewöhnt werden. Bevor eine Maus in einen Versuchsaufbau gesetzt wurde, wurde sie zunächst jedes Mal in eine sogenannte Zwischenbox gesetzt. Dies diente der Gewöhnung an die bevorstehende Prozedur und erzielte eine aktivere Teilnahme an den Experimenten. Sämtliche Versuchsgegenstände (Zwischenbox, Versuchsbox, Objekte etc.) wurden vor

jedem Versuchsbeginn sowie auch zwischen den einzelnen Durchgängen sorgfältig mit 70% EtOH gereinigt und getrocknet, um eine olfaktorische Manipulation während des Versuches zu verhindern. Um bei speziellen Versuchsvorhaben, wie beispielsweise dem Novel Object Recognition Task (NORT), eventuelle Präferenzen zu minimieren, wurden unbekannte Objekte sowie Objekt- oder Interaktionsstandorte untereinander ausgleichend variiert (counterbalancing).

2.2.1.4.1 Soziale Interaktion (SI) – Ein-Kammer-Test

Um die Interaktion der Testmaus mit einer zweiten unbekannten Maus zu untersuchen, wurde der Ein-Kammer-Test für soziale Interaktion genutzt (Abb. 11). Soziale Interaktionen sind ein grundlegender Bestandteil im Umgang von Mäusen zur gegenseitigen Wiedererkennung, Partnerwahl und Etablierung hierarchischer Strukturen. Für den Test wurde die Testmaus einzeln zunächst für 2,5 Minuten an eine quadratische Box (40 x 40 x 40 cm) gewöhnt (Habituation), in der in der Mitte einer der Wände ein leerer, runder Plastikzylinder mit Plastikgitterstäben platziert wurde. Direkt im Anschluss an die Gewöhnung wurde eine unbekannte Maus gleichen Geschlechts, Alters und Stamms (C57BL/6J) in den Plastikzylinder gesetzt und die Interaktion der Testmaus mit der unbekannten Maus für weitere 2,5 Minuten mittels *EthoVision* aufgezeichnet. Durch das Gitter war eine taktile, visuelle und olfaktorische Interaktion möglich, jedoch konnten Kämpfe vermieden werden. Die Dauer der Kontakte gibt dabei Aufschluss über die soziale Interaktion und wird mit folgender Formel berechnet und als SI-Index wiedergegeben:

$$\text{SI-Index} = \left(\frac{\text{Interaktionszeit mit unbekannter Maus [sec]}}{\text{Interaktionszeit mit Plastikzylinder [sec]}} \right) \times 100$$

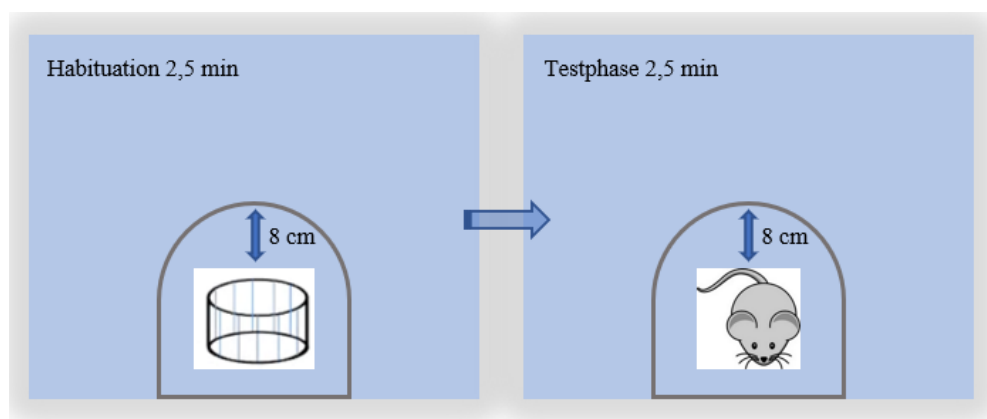


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ein-Kammer-Tests für soziale Interaktion.

2.2.1.4.2 Nestbau (NB)

Der Nestbau ist eine angeborene Verhaltensweise, welche sowohl bei männlichen als auch weiblichen Nagetieren zum Zwecke der Fortpflanzung, Wärmespeicherung und als Schutz ausgeübt. Dieses Verhalten kann auch bei Tieren in einer Laborumgebung beobachtet und studiert werden. Ein reduzierter Nestbau deutet auf Änderungen des Wohlbefindens oder eine beeinträchtigte Aktivität hin und wird darüber hinaus auch als Maß für soziales Verhalten herangezogen. Hierfür wurde die Testmaus einzeln über Nacht in einen Haltungskäfig mit Einstreu, Futter und Wasser platziert, aus dem zuvor alle Anreicherungsmaterialien entfernt wurden. Etwa eine Stunde vor Beginn der Dunkelphase wurde jedem Käfig ein zuvor gewogenes Nestlet (Gewicht zwischen 2 bis 3 g) beigelegt. Am Morgen des darauffolgenden Tages wurde die Qualität des aus dem Nestlet gebauten Nestes anhand einer Skala von 1 bis 5 bewertet (Deacon, 2006), wobei der Wert 1 einem noch zu mehr als 90 % intakten Nestlet und damit fast nicht vorhandenen Nest und der Wert 5 einem zu mehr als 90 % in einem Nest verbauten Nestlet entspricht. Zudem wurde der übrig gebliebene Teil des Nestlet gewogen, um die Menge des verarbeiteten Materials zu berechnen.

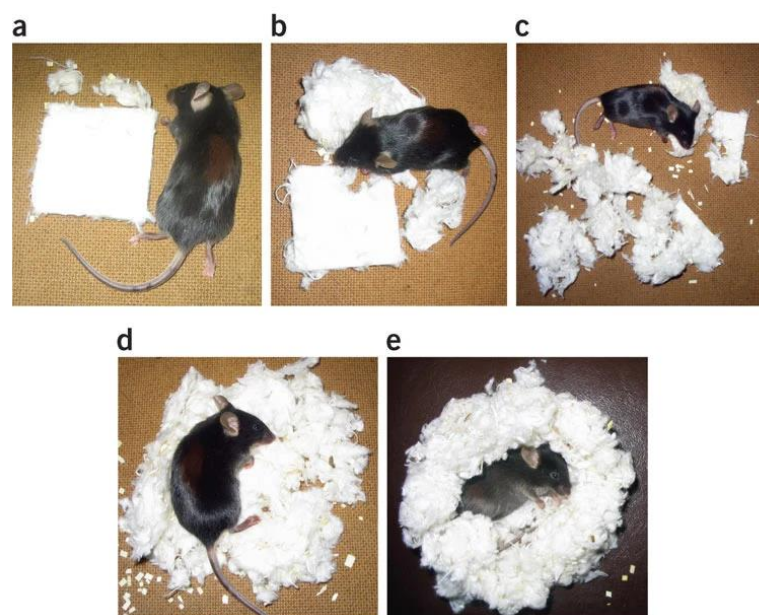


Abbildung 12: Analyse des Nestbau Verhaltens anhand des Score Sheets von Deacon (Deacon, 2006) wobei a) dem Wert 1 und einem noch zu mehr als 90 % intakten Nestlet und der Wert 5 (e) einem zu mehr als 90 % verbauten Nestlet entspricht.

2.2.1.4.3 Körperpflege

Die Körperpflege bei Mäusen ist eine natürliche und gelegentlich auftretende Verhaltensweise, um Komfort und Aussehen sowie die Reinheit des Fells zu erhalten. Das Putzmuster folgt einer Sequenz bestimmter Bewegungen, wie bereits in Smolinsky et al. (2009) publiziert (Abb. 13). Hierbei handelt es sich um elliptische Streichbewegungen (Phase 1), einseitige Streichbewegungen (Phase 2), beidseitige

Streichbewegungen (Phase 3) sowie das Lecken des Körpers (Phase 4). Für diesen Test wurde die Testmaus auf den Boden einer durchsichtigen Glasvase (Durchmesser 10 cm, Höhe 25 cm) gesetzt und ihr Verhalten für 15 Minuten mithilfe einer Videokamera aufgezeichnet. Mithilfe des Software Programms BORIS wurde im Anschluss die Zeit gemessen, in der die Maus ein für Nagetiere typisches Putzverhalten zeigte. Die Dauer der Körperpflege erlaubt eine Aussage über repetitives und stereotypisches Verhalten.

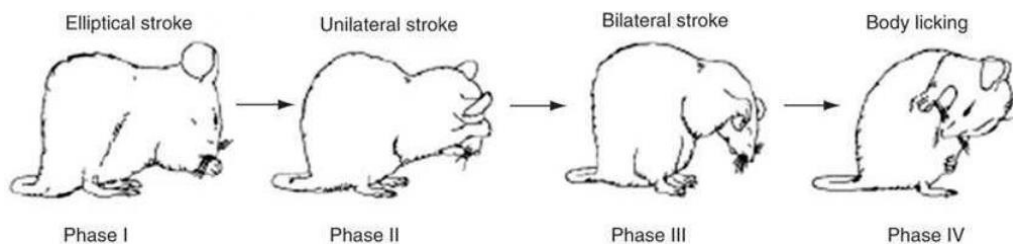


Abbildung 13: Sequentielles Putzmuster nach (Smolinsky et al., 2009). Exemplarische Darstellung der elliptischen Streichbewegungen (Phase 1), einseitigen Streichbewegungen (Phase 2), beidseitigen Streichbewegungen (Phase 3) sowie des Leckens des Körpers (Phase 4).

2.2.1.4.4 Wiedererkennung neuartiger Objekte nach 24 Stunden und nach 7 Tagen (24 h NORT und 7 d NORT)

Beim Objektwiedererkennungstest wird das Kurz- und Langzeit-Gedächtnis einer Testmaus analysiert, indem untersucht wird, ob sie in der Lage ist, nach einer gewissen Zeit (24 Stunden oder sieben Tage) zwischen verschiedenen Objekten zu unterscheiden und bereits bekannte Objekte wiederzuerkennen. Hierbei macht man sich zunutze, dass Mäuse typischerweise eher neuartige Gegenstände erkunden und bereits bekannten vorziehen. Dazu wurden der Testmaus nach Habituation an eine quadratische weiße Box (40 x 40 x 40 cm) in der ersten Trainingsphase über eine Dauer von 5 Minuten zwei identische Objekte präsentiert, bis sie jedes dieser für mindestens 15 Sekunden explorieren konnte. Die Objekte befanden sich hierbei in zwei benachbarten Ecken der Box, ca. 8 cm von der Wand entfernt. Das gleiche Prozedere mit den gleichen Objekten wurde 24 Stunden später in der zweiten Trainingsphase wiederholt. Nach einer spezifischen Zeitspanne von entweder 24 Stunden oder sieben Tagen wurde in der Testphase eines der beiden Objekte gegen ein neues Objekt ersetzt und die Maus konnte für weitere 5 Minuten beide Objekte explorieren (Abb. 14). Gemessen wurde die Zeit, welche die Maus mit dem bekannten und unbekanntem Objekt verbringt, mit folgender Formel verrechnet und als Discrimination Index (DI) wiedergegeben:

$$\text{Discrimination Index (DI)} =$$

$$\frac{(\text{Explorationszeit unbekanntes Objekt [s]} - \text{Explorationszeit bekanntes Objekt [s]})}{(\text{Explorationszeit unbekanntes Objekt [s]} + \text{Explorationszeit bekanntes Objekt [s]})}$$

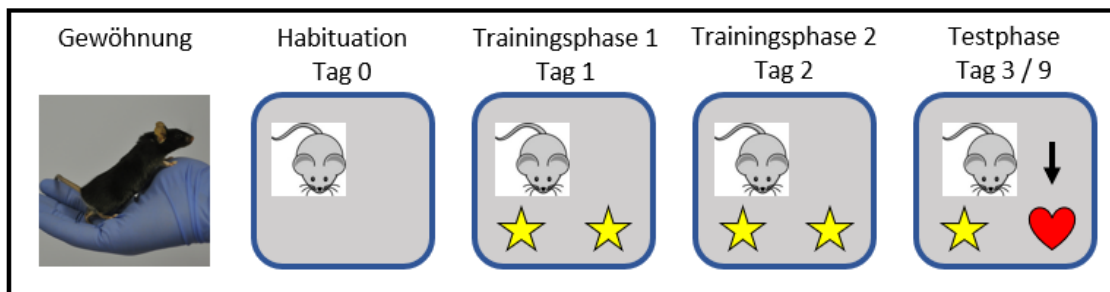


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Tests zur Wiedererkennung neuartiger Objekte nach 24 Stunden und nach 7 Tagen. Präsentiert werden in der Trainingsphase 1 und 2 zwei identische Objekte, in der Testphase (nach 24 Stunden oder 7 Tagen) wird eines der bekannten durch ein neues Objekt ersetzt.

2.2.1.4.5 Episodische Gedächtnisbatterie

Diese Testbatterie gibt Aufschluss über die episodische Gedächtnisleistung der Testmäuse, indem die zeitliche Komponente noch durch eine räumliche beziehungsweise kontextuelle Komponente erweitert wird. Der Test wurde in einer Box (43 x 50 x 45 cm) durchgeführt, deren Boden und Wände austauschbar sind, um verschiedene Umgebungen zu generieren. Die erste Umgebung bestand aus einem Boden in Holzoptik und Wänden in Fliesenoptik mit schwarz-weißem Mosaikmuster, die zweite Umgebung aus einem Boden in Fliesenoptik und Wänden in Holzoptik. Zwei identische Objekte A1 und A2 wurden in zwei benachbarten Ecken der Box, ca. 8 cm von der Wand entfernt, platziert. Die Testmaus wurde in gleicher Entfernung zu beiden Objekten in die Arena gesetzt und während der Trainingsphase für drei Minuten mithilfe des Videoüberwachungssystems EthoVision aufgezeichnet. Zwischen den Tests wurden Arena und Objekte gereinigt und die Position der neuen und bekannten Objekte miteinander vertauscht, um eine Beeinflussung der Objektwahl durch den Geruchssinn zu vermeiden.

Die episodische Gedächtnisbatterie besteht aus vier verschiedenen Tests, die alle ähnlich wie der gewöhnliche Wiedererkennungstest für neuartige Objekte aufgebaut sind. Jeder der Tests wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit täglich neuen Objektpaaren durchgeführt (Montag bis Donnerstag). Nach dreitägiger Pause wurde am darauffolgenden Montag mit dem nächsten Test begonnen. Die einzelnen Tests unterscheiden sich darin, dass nicht nur zu einer bestimmten Zeit, sondern auch an einer bestimmten Lokation in einem bestimmten Kontext bekannte bzw. unbekannte Objekte präsentiert werden. Die einzelnen Tests werden nachfolgend genauer beschrieben.

Novel Object Recognition (NOR): Mit diesem Test soll, wie bereits in 2.2.2.4.4 beschrieben, bestimmt werden, ob die Testmaus in der Lage ist, zwischen verschiedenen

Objekten zu unterscheiden und bereits bekannte Objekte wiederzuerkennen. Zunächst wurden zwei identische Objekte in der Arena positioniert. Die Maus hat innerhalb einer Spanne von 3 Minuten Zeit, jedes Objekt für mindestens 15 Sekunden zu explorieren. Danach wurde die Testmaus für 2 Minuten aus der Arena genommen und eines der beiden bekannten Objekte gegen ein unbekanntes ausgetauscht. Die Testmaus wurde in die Arena zurückgesetzt und konnte die Objekte für weitere 3 Minuten explorieren. Bestimmt wurde die Zeit, welche die Maus mit der Exploration des bekannten und unbekanntes Objekts verbringt, und diese mittels Discrimination Index wiedergegeben. Jede Maus durchläuft diesen Test insgesamt viermal mit Inter-Test-Intervallen von mindestens 24 Stunden. Zwei Tests werden in der ersten und zwei in der zweiten Umgebung durchgeführt.

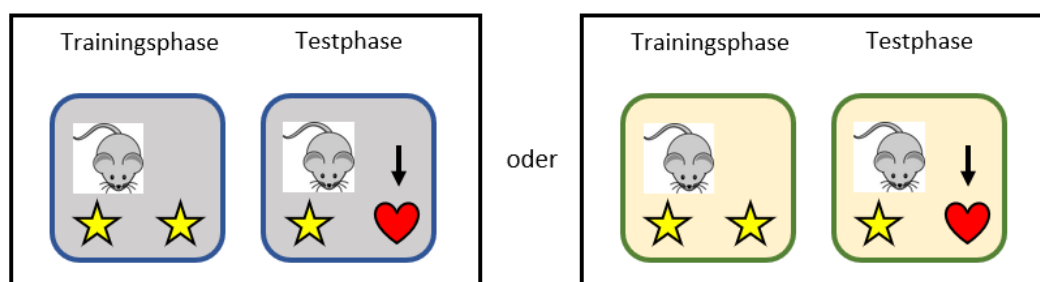


Abbildung 15: Schematische Darstellung des NOR Tests; präsentiert werden in der Trainingsphase zwei identische Objekte, in der Testphase wird eines der bekannten durch ein neues Objekt ersetzt. Der Test findet entweder in Umgebung 1 (blau/grau) oder Umgebung 2 (grün/gelb) statt.

Object Place Recognition (OPR): Die Versuchsdurchführung war identisch zum NOR, mit dem Unterschied, dass die Testmaus zunächst in eine Arena mit zwei unterschiedlichen Objekten gesetzt und später eines dieser Objekte durch eine Kopie des verbleibenden Objektes ersetzt wurde, welches an einer anderen Stelle platziert war. Die Testmaus explorierte nun zwei identische Objekte, eines an einem bekannten, das andere an einem neuen Ort.

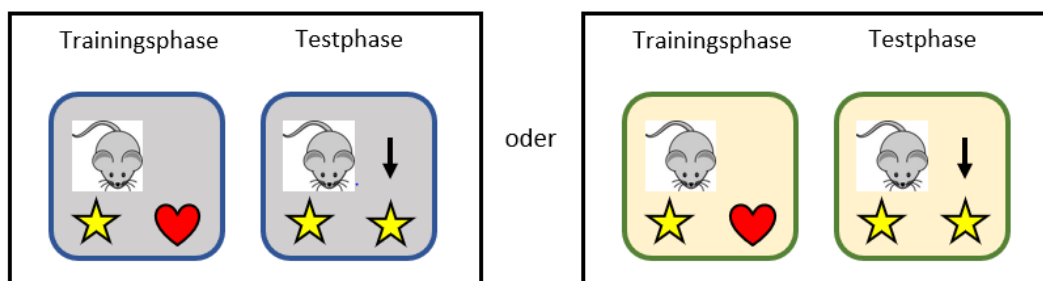


Abbildung 16: Schematische Darstellung des OPR Tests; präsentiert werden in der Trainingsphase zwei unterschiedliche Objekte, in der Testphase wird eines dieser durch eine Kopie des verbleibenden Objekts ersetzt. Der Test findet entweder in Umgebung 1 (blau/grau) oder Umgebung 2 (grün/gelb) statt.

Object Context Recognition (OCR): Die Versuchsdurchführung war identisch mit der des NOR. Jeder Versuchsdurchgang bestand aus zwei Trainings- und einer Testphase,

zwischen denen jeweils ein Intervall von zwei Minuten lag. Während der ersten Trainingsphase wurden zwei identische Objekte in der Arena im Kontext der ersten oder zweiten Umgebung präsentiert. In der zweiten Trainingsphase wurde die Arena mit der alternativen Umgebung gewählt. Wurde also beispielsweise in der ersten Trainingsphase die erste Umgebung verwendet, wurde in der zweiten Trainingsphase die zweite Umgebung benutzt. Zudem wurden in der zweiten Trainingsphase zwei identische, neue Objekte präsentiert. In der Testphase wurde entweder die erste oder die zweite Umgebung gewählt. Nun wurde ein Objekt der ersten und ein Objekt der zweiten Trainingsphase präsentiert. Es waren demnach sowohl die Umgebung als auch die beiden Objekte bekannt. Während eines der Objekte auch in der bekannten Umgebung präsentiert wurde, war die Objekt-Umgebung Konfiguration für das zweite Objekt hingegen neu. Jede Testmaus absolvierte den Test viermal; in der ersten Trainingsphase wurden zwei Durchgänge in der ersten Umgebung und zwei in der zweiten Umgebung durchgeführt. In der zweiten Trainingsphase wurde immer die jeweils andere Umgebung verwendet. In der Testphase wurden zwei Versuche mit der ersten oder der zweiten Umgebung durchgeführt. Jeweils ein Versuch in jeder Umgebung enthielt die neue Objekt-Umgebung Konfiguration auf der linken Seite, während der zweite Versuch sie auf der rechten Seite präsentierte.

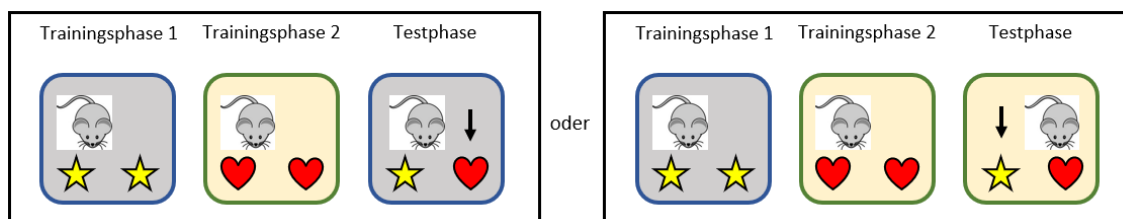


Abbildung 17: Schematische Darstellung des OCR Tests; präsentiert werden in Trainingsphase 1 zwei identische Objekte in Umgebung 1 (blau/grau) und in Trainingsphase 2 zwei andere identische Objekte in Umgebung 2 (grün/gelb). Die Testphase findet entweder in Umgebung 1 oder 2 statt. Hier wird nun sowohl ein Objekt aus Trainingsphase 1 als auch aus Trainingsphase 2 präsentiert, sodass eines der Objekte in einer neuen Objekt-Umgebung Konfiguration auftaucht.

Object Place Context Recognition (OPCR): Die Versuchsdurchführung war ähnlich zu der des OCR. Unterschiede bestanden darin, dass in der ersten Trainingsphase zwei unterschiedliche Objekte präsentiert und in der zweiten Trainingsphase identische Kopien dieser Objekte präsentiert wurden, allerdings deren Standorte vertauscht waren. Während der Testphase wurden zwei identische Kopien eines der beiden Objekte präsentiert. Die Gestaltung der Umgebungen während der Trainings- und Testphasen erfolgte wie beim OCR. Jede Testmaus absolvierte vier Durchläufe. In der Testphase wurden zwei Versuche in der ersten Umgebung und zwei Versuche in der zweiten Umgebung durchgeführt. Jeweils ein Versuch in jeder Umgebung enthielt die neue Objekt-Standort-Umgebung Konfiguration auf der linken Seite, während der zweite Versuch sie auf der rechten Seite präsentierte.

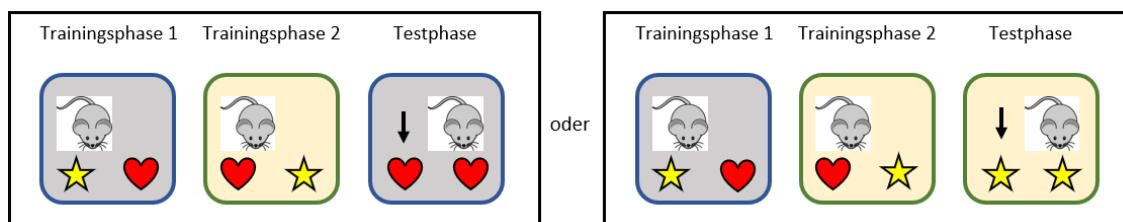


Abbildung 18: Schematische Darstellung des OPCR Tests; präsentiert werden in Trainingsphase 1 zwei unterschiedliche Objekte in Umgebung 1 (blau/grau) und in Trainingsphase 2 die gleichen beiden unterschiedlichen Objekte in Umgebung 2 (grün/gelb). Die Testphase findet entweder in Umgebung 1 oder 2 statt. Hier wird nun eines der Objekte durch eine Kopie des verbleibenden Objekts ersetzt, sodass eines der Objekte in einer neuen Objekt-Standort-Umgebung Konfiguration auftaucht.

2.2.1.5 Stereotaktische Injektion

Mittels stereotaktischer Injektion ist es möglich, verschiedene niedermolekulare Substanzen oder Viren in spezifische Hirnregionen zu applizieren. Hierbei handelt es sich um ein minimalinvasives Verfahren, bei dem der Kopf des Versuchstieres in einem fest verschraubten Rahmen fixiert ist, um höchste Präzision zu gewährleisten. Die Injektionen liefen im Allgemeinen nach folgendem Protokoll ab (kleine experimentspezifische Änderungen sind den nachfolgenden Kapiteln zu entnehmen):

Zu Beginn der Operationsvorbereitungen wurde das Versuchstier mit Hilfe einer dafür vorgesehenen Induktionskammer aus Plexiglas in eine oberflächliche Isofluran-Anästhesie versetzt. Nach Ausbleiben einer Schmerzreaktion, getestet anhand des Zwischenzehenreflexes, wurden die Augen des Versuchstiers mit Augensalbe (Bepanthen; Roche, Grenzach-Wyhlen) überschichtet, um sie vor Austrocknung zu schützen. Mit einem Skalpell wurde von kranial ein ca. 3 cm langer Schnitt an der Schädeloberseite bis zum kranio-kaudalen Übergang durchgeführt. Der Schädel wurde freigelegt, mittels 70 % EtOH desinfiziert und mittels 3 % H₂O₂ getrocknet. Anschließend wurde das Tier in Brustlage auf einem Wärmepad in einen Stereotaxierahmen (David Kopf, Tujunga, USA; vgl. Abb. 19) fixiert. Hierbei wurden die Incisivi maxillaris in eine Bisschiene eingelegt und die Zungen vorgelagert, um eine ausreichende Versorgung mit Isofluran sowie eine gute Ventilation der Atemwege zu gewährleisten. Die Isofluran-Konzentration wurde so eingestellt, dass eine tiefe Narkose, erkennbar an einem Exophthalmus und niedriger Atemfrequenz mit hohem Atemzugvolumen, bestand. Der Kopf wurde beidseitig mit Fixierschrauben an Kiefer- und Scheitelbein in Position gebracht; hierbei sollten Bregma und Lambda eine gemeinsame Ebene bilden (siehe Abb. 20). Für die nachfolgenden Schritte wurde ein Binokular mit Lampe verwendet.



Abbildung 19: Bildliche Darstellung eines KOPF-Stereotakten mit zugehöriger Stereotaxie-Einheit zum vereinfachten Ablesen der Koordinaten (Abbildung von KOPF® instruments).

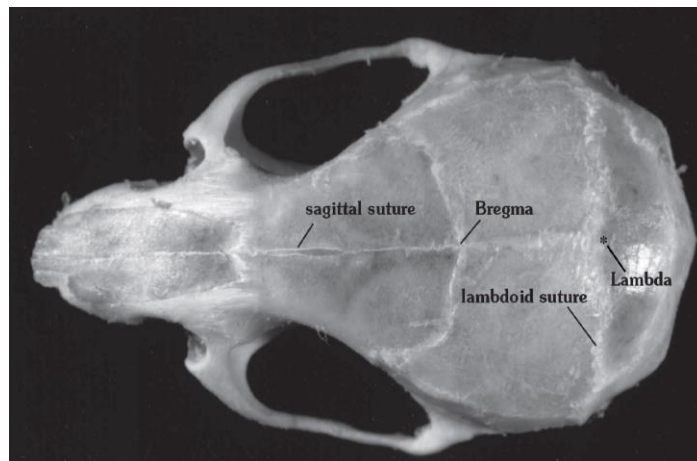


Abbildung 20: Lokation von Bregma und Lambda, definiert von Dr. George Paxinos und Dr. Keith Franklin in „The Maus brain in stereotaxic coordinates“. Diese Punkte dienen als Referenzpunkte zur Errechnung und Bestimmung der stereotaktischen Koordinaten entlang der drei verschiedenen Ebenen.

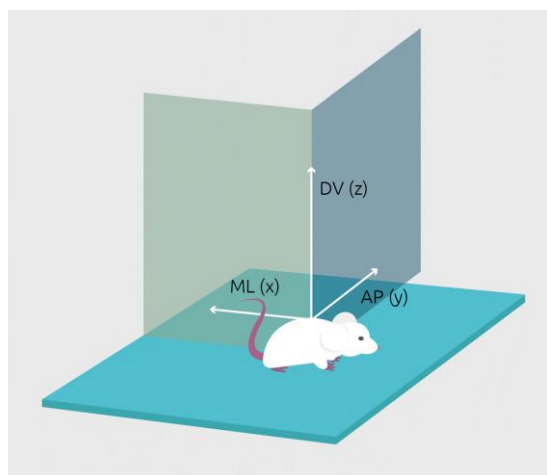


Abbildung 21: Schematische Darstellung der drei Ebenen im stereotaktischen Apparat. Hierbei beschreibt die anteroposteriore Y-Achse (AP) die Ebene vom vorderen zum hinteren Teil des Kopfes, die mediolaterale X-Achse (ML) die Ebene entlang der Mittellinie nach rechts oder links und die dorsoventrale

Z-Achse (DV) die Ebene, die von der Oberfläche des Schädels zum Inneren des Gehirns verläuft (Abbildung verändert nach Conductscience).

Nun wurden die jeweiligen Koordinaten auf beiden Hemisphären mit Hilfe der Stereotaxie-Einheit an der X- bzw. Y-Achse abgelesen und mit einem chirurgischen Stift markiert (vgl. Abb. 21). Die Koordinaten sind in den nachfolgenden Kapiteln tabellarisch aufgelistet. An den jeweiligen Markierungen wurde mit einem Zahnarztbohrer eine kleine Öffnung gebohrt (ca. 1 mm Durchmesser), bis nur noch eine dünne Schicht des Schädelknochens übrigblieb. Diese wurde mit Hilfe eines Mikrodissektionsskalpells vorsichtig abgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, die Dura mater nicht zu eröffnen. Im Falle subduraler Blutungen wurden diese mithilfe kleiner Gelatineschwämme (Gel Foam, Pfizer), getränkt in steriler Kochsalzlösung, gestillt.

Die Injektionslösung wurde nun stereotaktisch entweder mit Hilfe einer Hamilton-Spritze oder selbstgezogener Glaskapillare, verbunden mit einem Nanoinjektions-Applikator (Nanoject 2000, Fa. WPI) mit spezifischer Geschwindigkeit und Volumen in die jeweilige Hirnregion appliziert. Nach Injektion wurden die Spritze bzw. Kanüle für weitere drei Minuten zur Diffusion der Lösung im Zielort belassen, danach erfolgte der Rückzug. Am Ende der Operation wurde die Einstichstelle mit Knochenwachs versiegelt, die Schädelhäute mit speziellen Heftklammern verschlossen und zur Analgesie 5mg/kg Körpergewicht Carprofen intraperitoneal injiziert. Bis zum Aufwachen aus der Narkose wurde das Tier in seinem Käfig auf einer Heizplatte bei 37°C platziert, um ein Auskühlen des Körpers während der Aufwachphase zu vermeiden.

Die Tiere wurden bis zur vollständigen Regeneration überwacht und versorgt. Eine Wundkontrolle fand in der ersten Woche bei der täglichen Kontrolle der Tiere statt.

2.2.1.5.1 Stereotaktische Injektion von Cholera-toxin-B zur Analyse der neuronalen Projektionen – Neuroanatomisches Tracing

Beim neuroanatomischen Tracing macht man sich die Transportmechanismen innerhalb der Neurone zu Nutze, durch welche für gewöhnlich der Stoffaustausch zwischen Synapse und Zellkörper gewährleistet wird. Diese Methode ermöglicht eine Analyse neuronaler Projektionen und funktionaler Verbindungen von einem einzelnen Neuron oder einer definierten Population von Neuronen hin zu ihren verschiedenen Zielen im gesamten Nervensystem. Unterschieden werden zwei verschiedene Transportwege, der anterograde axonale Transport, der stromabwärts in Richtung der Synapse erfolgt, und der retrograde axonale Transport, welcher stromaufwärts von der Synapse Richtung

Soma stattfindet. Cholera-Toxinkonjugate gelten als nicht-virale retrograde Tracer, dessen Bewegung entlang des Axons hin zum Zellkörper aufgrund spezieller gekoppelter Alexa Fluor™ Farbstoffe mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann (vgl. Abb. 22). Verwendet wurde das rekombinante Cholera Toxin Subunit B (Invitrogen™) in drei verschiedenen Ausführungen, jeweils gekoppelt an ein anderes Alexa Fluor™ Konjugat (Tabelle 14). Diese Molecular Probes® Cholera-Toxin-Konjugate (CT-B) bestehen nur aus einer rekombinanten Version der B-Untereinheit, welche vollständig frei von der toxischen A-Untereinheit ist.

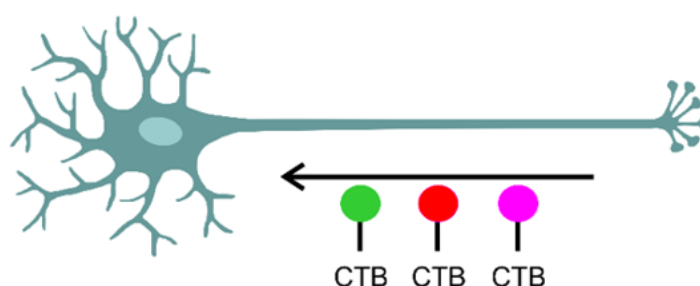


Abbildung 22: Schematische Darstellung des retrograden Transports der drei verschiedenen Cholera-Toxinkonjugate. Transport erfolgt stromaufwärts von der Synapse Richtung Soma.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Molecular Probes® Cholera-Toxin-Konjugate mit ihrem spezifischen Wellenlängenbereich und der Katalognummer von ThermoFisher Scientific.

CTB Konjugat	Farbstoff/ Wellenlänge	Katalognummer
CTB Alexa Fluor™ 488	Grün (495/519 nm)	C22841
CTB Alexa Fluor™ 555	Rot (555/565 nm)	C22843
CTB Alexa Fluor™ 647	Infrarot (650/668 nm)	C34778

Die stereotaktische Injektion erfolgte nach beschriebenem Protokoll in 2.2.1.5. Zur Injektion wurde für jedes der 3 CT-Bs eine neue selbstgezogene Glaskapillare verwendet. Injiziert wurde das CTB Alexa Fluor™ 488 in den dorsalen Hippocampus, das CTB Alexa Fluor™ 555 in den ventralen Hippocampus und das CTB Alexa Fluor™ 647 in den entorhinalen Cortex (siehe Abb. 23).

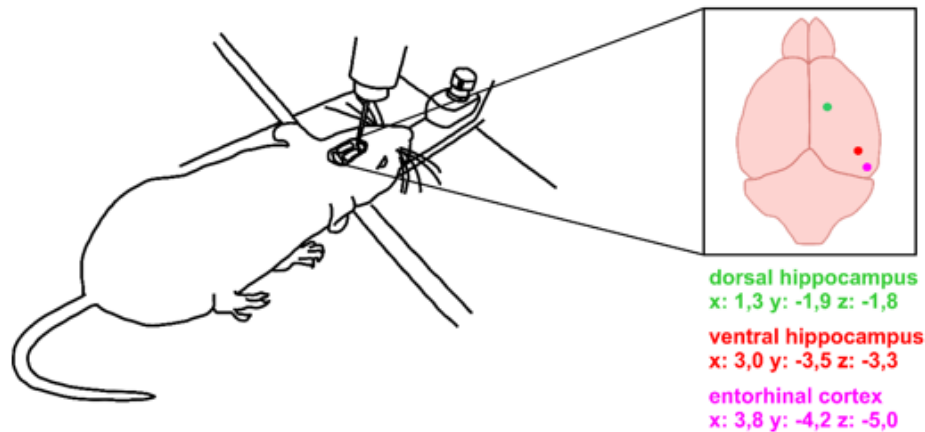


Abbildung 23: Visualisierung der drei verschiedenen CT-B Injektionsstellen mit den spezifischen Koordinaten. Grün visualisiert die Injektion des CTB Alexa Fluor™ 488 in den dorsalen Hippocampus, rot das CTB Alexa Fluor™ 555 in den ventralen Hippocampus und pink das CTB Alexa Fluor™ 647 in den entorhinalen Cortex.

Die mit Hilfe des Atlas „The Maus brain in stereotaxic coordinates“ (*Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates - George Paxinos, Keith B.J. Franklin - Google Books, n.d.*) bestimmten stereotaktischen Koordinaten sind in Tabelle 15 einzusehen (vgl. Abb. 24-26). Injiziert wurde unilateral in die rechte Hemisphäre. Die Konzentration der einzelnen CT-Bs lag bei 5 µg/µl, von denen je 200 nl mit einer Geschwindigkeit von 20 nl/min injiziert wurden. Nach einer postoperativen Pause von 7 Tagen wurden die Tiere mittels cervicaler Dislokation abgetötet, das Gehirn möglichst schnell entnommen und in 4% Paraformaldehyd wenigstens 8 Stunden oder über Nacht bei 4°C fixiert. Nach Fixation wurden die Hirne in eiskaltes PBS überführt und bis zur Anfertigung der Schnitte bei 4°C gelagert. Die einzelnen Hirne wurden vollständig von posterior nach anterior in 70 µm dicke, koronale Schnitte am semiautomatischen Vibratom (Leica VT1200) geschnitten und jeder zweite Schnitt noch zusätzlich mit DAPI in einer Konzentration von 10 µg/ml für 30 Minuten gegengefärbt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger mit Vectashield® mounting Medium zur Erhaltung der Fluoreszenz platziert und mit einem Deckgläschen überdeckt. Im Anschluss wurde jeder einzelne Schnitt unter dem Epifluoreszenzmikroskop durchgescannt und projizierende Fluoreszenzsignale identifiziert. Positive Schnitte mit Fluoreszenzsignal wurden dann nochmals am Konfokalmikroskop (Leica) zur Bildaufnahme gescannt. Die entstandenen Bilder wurden im Anschluss mit Hilfe der Software Imaris (Oxford Instruments) prozessiert, durch welche ermöglicht wurde, spezifische Parameter zum Erkennen von Zellkörpern festzulegen und dadurch fluoreszierende Zellen in jedem Kanal zu

identifizieren, zu zählen und mit Koordinaten zu lokalisieren. Diese Informationen wurden letztlich mit der Software Matlab® (MathWorks) von einem Kooperationskollegen (, Institut für Physiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) verarbeitet.

Tabelle 15: Stereotaktische Koordinaten der Injektionsstellen des dorsalen/ ventralen Hippocampus und des entorhinalen Cortex.

Position	Koordinaten
dorsaler Hippocampus	anterior-posterior: -1,9 medial-lateral: 1,3 dorsal-ventral: -1,8
ventraler Hippocampus	anterior-posterior: -3,5 medial-lateral: 3,0 dorsal-ventral: -3,3
entorhinaler Cortex	anterior-posterior: -4,2 medial-lateral: 3,8 dorsal-ventral: -5,0

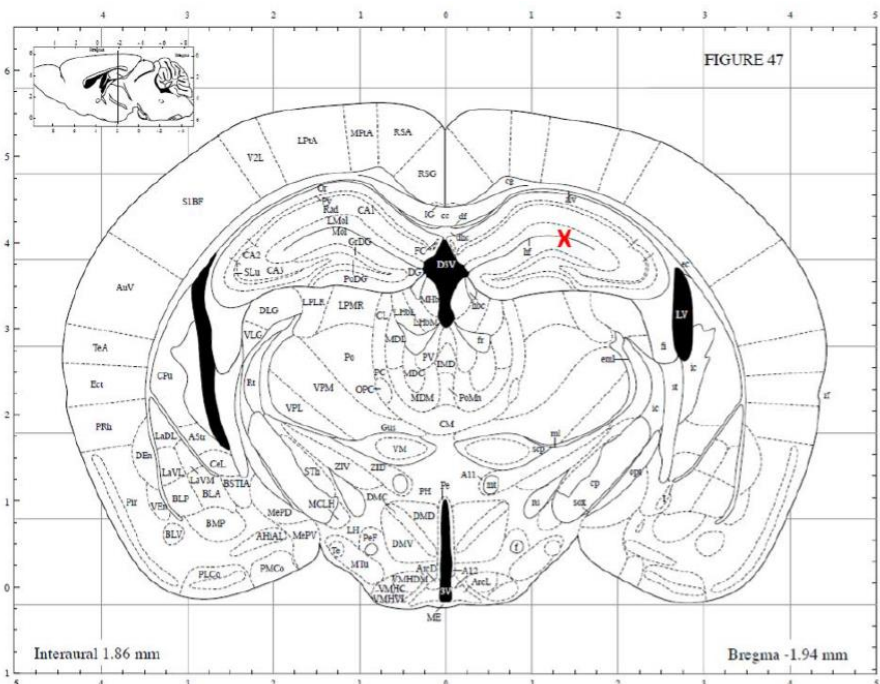


Abbildung 24: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des dorsalen Hippocampus, ausgehend von Bregma (aus Dr. George Paxinos und Dr. Keith Franklins „The Maus brain in stereotaxic coordinates“). Das rote Kreuz stellt die genaue Position der Injektion dar.

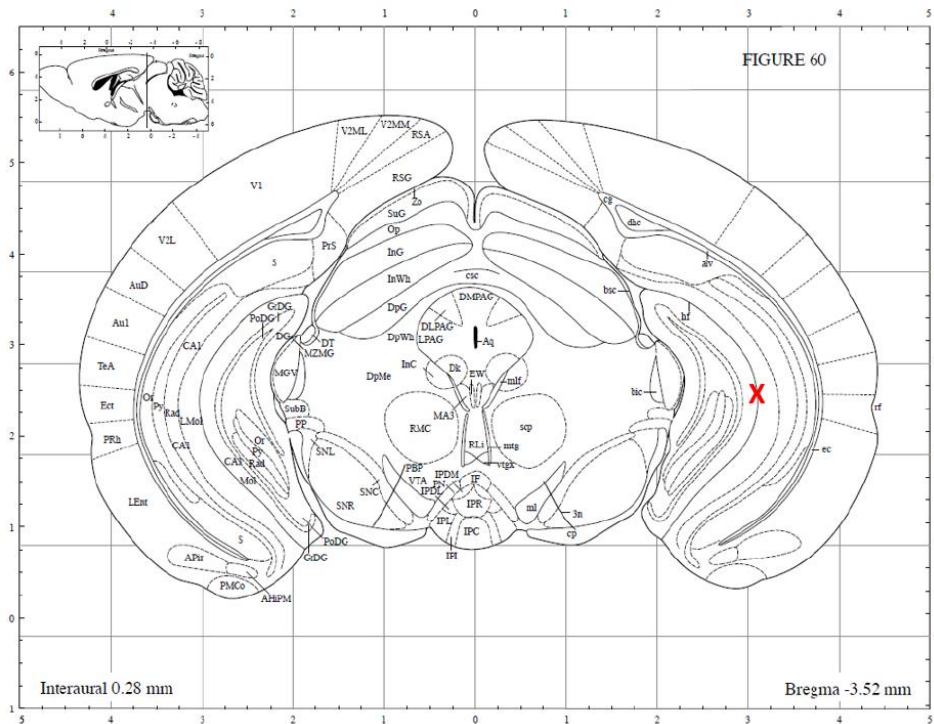


Abbildung 25: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des ventralen Hippocampus, ausgehend von Bregma (aus Dr. George Paxinos und Dr. Keith Franklins „The Maus brain in stereotaxic coordinates“). Das rote Kreuz stellt die genaue Position der Injektion dar.

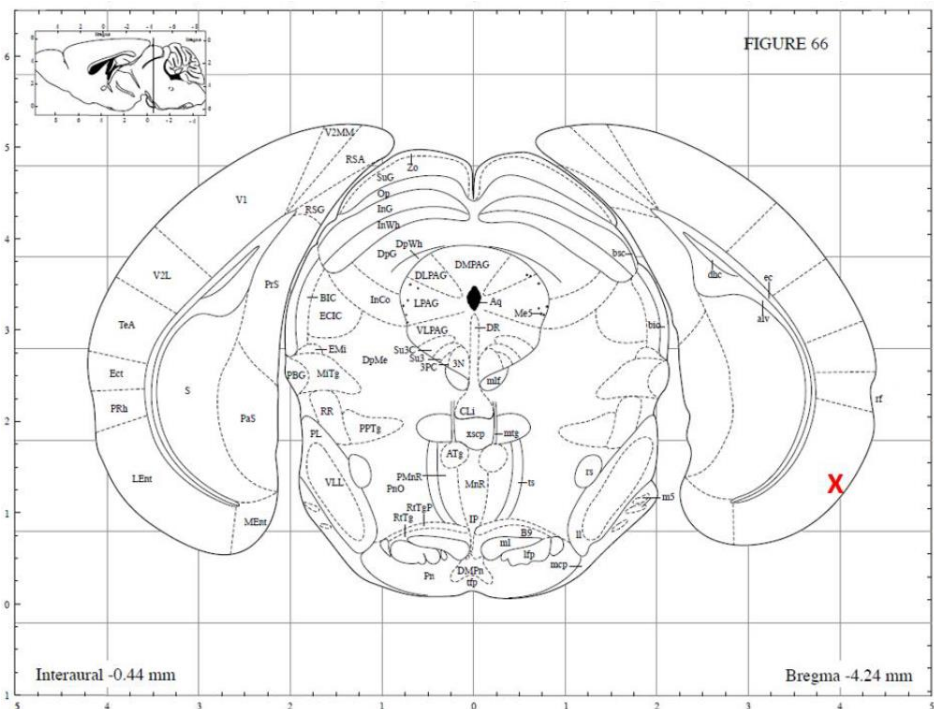


Abbildung 26: Coronales Diagramm zur Darstellung der Koordinaten für die Injektionsstelle des entorhinalen Cortex, ausgehend von Bregma (aus Dr. George Paxinos und Dr. Keith Franklins „The Maus brain in stereotaxic coordinates“). Das rote Kreuz stellt die genaue Position der Injektion dar.

2.2.1.5.2 Stereotaktische Injektion von IGF-II und Jasplakinolide

Rekombinantes IGF-II (R&D Systems) bzw. Jasplakinolide (JPK, Invitrogen™), wurde stereotaktisch in den Hippocampus von 8-10 Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Mäusen und Kontrollgeschwistertieren während des 7 d NORT (siehe 2.2.1.4.4) injiziert. Der 7 d NORT wurde demnach wie beschrieben durchgeführt, und durch die Injektion nach der Trainingsphase 2 ergänzt (siehe Abb. 27). Die Injektion von IGF-II erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Maria Pascual-Lucas (Pascual-Lucas et al., 2014), die von JPK in Anlehnung an das Protokoll von Wei Huang (W. Huang et al., 2013), beide analog zur in 2.2.1.5 beschriebenen Methodik. IGF-II wurde in PBS mit 0,1% BSA auf eine Konzentration von 250 ng/ μ l gelöst. Injiziert wurden 250 ng in den dorsalen Hippocampus beider Hemisphären; die Koordinaten entsprechen den in 2.2.1.5.1 beschriebenen Koordinaten für die Injektionsstelle des dorsalen Hippocampus. Injiziert wurde mit einer Hamilton Kanüle in einer Geschwindigkeit von 0.5 μ l/ min; die Injektionsnadel wurde weitere drei Minuten zur Diffusion der Lösung im Zielort belassen. Kontrolltiere wurden mit 1 μ l PBS+ 0,1 % BSA injiziert. JPK wurde in DMSO und 0.9% NaCl auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l gelöst. Injiziert wurden 50 ng in den dorsalen Hippocampus beider Hemisphären; die Koordinaten entsprechen den in 2.2.1.5.1 beschriebenen Koordinaten für die Injektionsstelle des dorsalen Hippocampus. Injiziert wurde mit einer Hamilton Kanüle in einer Geschwindigkeit von 0.5 μ l/ min; die Injektionsnadel wurde weitere drei Minuten zur Diffusion der Lösung im Zielort belassen. Kontrolltiere wurden mit 1 μ l DMSO + 0,9% NaCl injiziert. Fünf Tage nach Operation wurden die Mäuse der Testphase des 7 Tage NORT unterzogen, nach Versuchsende abgetötet und wie in 2.2.1.6 beschrieben das Hirngewebe isoliert.



Abbildung 27: Test zur Wiedererkennung neuartiger Objekte mit zusätzlicher IGF-II- oder JPK-Injektion an Tag 2.

2.2.1.6 Isolation muriner Gehirne

Nach Versuchsende wurden die Mäuse mittels cervicaler Dislokation ohne Betäubung abgetötet, da jegliche Anästhetika oder Gase einen Einfluss auf molekularbiologische Untersuchungen haben könnten. Diese Methode der cervikalen Dislokation geht mit der Luxation der Halswirbelsäule einher, gilt als die schmerzfreiste Methode und ist somit im Einklang mit dem Tierschutzgesetz TierSchG, §4 (1). Im Anschluss wurden die Tiere

dekapitiert, das Fell vom Nacken her über die Schädeldecke gezogen und der Schädel durch einen Schnitt entlang der sagittalen Naht eröffnet. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette konnte die Schädeldecke nun zu beiden Seiten bis über die Interaurallinie hinweg weggeklappt werden. Um das Gehirn vollständig und ohne Verletzung aus dem Schädel zu isolieren, wurde ein dünner Spatel unterhalb des Hirns bis hin zum Bulbus olfactorius eingeführt, das Hirn leicht angehoben und vorsichtig herausgelöst. Gehirne, die vor der Entnahme nicht perfusionsfixiert wurden, mussten umgehend eingefroren werden, um die anatomische und biochemische Struktur möglichst zu erhalten. Dabei kam pulverisiertes Trockeneis zur Anwendung. Im Anschluss wurden die Gehirne bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.2 *In vitro* Experimente

2.2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1.1 Isolation von RNA aus Gewebe

Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurden murine Gehirne nach cervicaler Dislokation möglichst schnell entnommen, die Gehirne in RNA_{later} eingelegt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die entsprechenden Hirnareale (Cortex und Hippocampus) wurden nun unter dem Binokular präpariert und mit $200\ \mu\text{l}$ (Cortex) bzw. $100\ \mu\text{l}$ (Hippocampus) Trizol versetzt. Das Gewebe wurden mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (Pellet pestles, blue polypropylene, Sigma-Aldrich-Aldrich) zerkleinert und das Volumen mit Trizol auf $1\ \text{ml}$ aufgefüllt. Durch Vortexen wurde eine homogene Suspension hergestellt, die über $5\ \text{min}$ inkubiert wurde. Nach Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ Chloroform wurde die Lösung so lange gevortext, bis sie rosa milchig war, und $2\ \text{Minuten}$ bei RT inkubiert. Für die Phasentrennung wurden die Proben für $20\ \text{min}$ bei 4°C und $12000\ \text{g}$ zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in jeweils $0,5\ \text{ml}$ eiskaltes Isopropanol überführt, das Gemisch leicht geschwenkt und $10\ \text{min}$ bei RT inkubiert. Es folgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei $13600\ \text{g}$ und 4°C . Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit $70\ \%$ -igem Ethanol gewaschen und für $5\ \text{min}$ bei $12000\ \text{g}$ und 4° zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Die weißlichen RNA-Pellets wurden so lange luftgetrocknet, bis sie glasig erschienen. Corticale RNA-Pellets wurden in $200\ \mu\text{l}$ RNA-freiem Wasser gelöst, hippocampale Pellets hingegen in $30\ \mu\text{l}$. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer. Die gewonnene RNA wurde bei $-80\ ^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2.1.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription beschreibt die enzymatische Umkehrung der Transkription, also die Übersetzung der Sequenzabfolge einer RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkriptase. Hierfür wurde die gewünschte Menge GesamtrNA (150 – 500 ng) in ein Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit dem PrimeScript™ RT Master Mix und Wasser auf die Gesamtmenge von 10 µl pro Reaktion aufgefüllt. Als Primer dienten dabei Oligo-dT-Nukleotide und random Hexamer-Oligonukleotide. Die Umschreibung erfolgte für 15 min bei 37°C. Abschließend wurde die reverse Transkriptase bei 85°C für 5 min inaktiviert. Der Ansatz wurde 1:10 mit RNA-freiem Wasser verdünnt und entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

2.2.2.1.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Methode der quantitativen Real-time PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der Standard-PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA während eines PCR-Zyklus mittels Fluoreszenzmessung. Hierbei nimmt die Fluoreszenzmenge proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der DNA-Farbstoff SYBR Green (SYBR Premix Ex Taq™) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch diese fluoresziert und detektiert werden kann. Zur Bestimmung der ursprünglichen DNA-Konzentration wurde der sogenannte CT-Wert (Cycle Threshold) genutzt, der den erstmaligen signifikanten Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum Hintergrund beschreibt. Je mehr cDNA zu Beginn der RT-qPCR in einer Probe vorlag, desto mehr Kopien entstanden während des Polymerisierungszyklus. Ein *Ct*-Wert ist umso kleiner, je mehr cDNA zu Beginn vorlag. Jede Probe wurde in einem dreifachen Ansatz (Triplikate) amplifiziert und die ermittelten CT-Werte über einen Mittelwert zusammengefasst. Eine relative Quantifizierung erfolgte durch Normierung der Expressionslevel zum Haushaltsgen *GAPDH*. Für die qPCR wurden die cDNA-Samples zunächst auf 5 ng/µl verdünnt. Anschließend wurde ein Mastermix bestehend aus 0,4 µl Primer (10 µM), 5 µl SYBR® Premix Ex Taq™ II und 2,6 µl dH₂O (Angaben pro Well einer 96-Well-Platte) angefertigt. 2 µl der verdünnten cDNA wurden in drei technischen Replikaten vorgelegt und anschließend 8 µl des Mastermixes hinzugegeben. Nach Versiegelung der Platte mit einer Folie (Absolute qPCR Plate Seal) wurde diese in das StepOnePlus™ Real-Time PCR System überführt und unter folgendem Programm gestartet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Thermocyclerprogramm für die qPCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1. Denaturierung	94	3 min
2. Denaturierung	94	30 sec
3. Annealing	62	30 sec
4. Elongation	72	30 sec
5. Loop	Zurück zu Schritt 2	35 x
6. Elongation	72	10 min
7. Lagerung	4	∞

2.2.2.1.4 Isolation von Proteinen aus Gewebe

Murine Gehirne wurden nach cervicaler Dislokation möglichst schnell entnommen und die entsprechenden Areale auf Eis präpariert. Das Gewebe wurde in *MagicMix* (vgl. Tabelle 17) inklusive 1% β -Mercaptoethanol überführt und mit Hilfe des elektrischen Homogenisators zerkleinert. Im Anschluss wurden die Proben für eine Stunde bei 4°C geschüttelt und dann über QIAshredder-Säulen homogenisiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Die Lysate wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Protein-Lyse-Puffers *MagicMix*

Puffer	Zusammensetzung
2x Magic Mix	48 % Harnstoff
	14 mM Tris pH 7,5
	8,7% Glycerin
	1 % SDS
	1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette
	ddH ₂ O

2.2.2.1.5 Isolation von Synaptosomen aus Gewebe mittels Succrosegradient

Murine Gehirne wurden nach cervicaler Dislokation möglichst schnell entnommen und die entsprechenden Areale auf Eis präpariert. Die zu untersuchenden Hirnareale wurden

zunächst gewogen, um die Menge der einzusetzenden Puffer zu kalkulieren. Die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 18 einzusehen. Alle Puffer und Materialien wurden während der Fraktionierung bei 0-4°C gekühlt bzw. alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Tabelle 18: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Fraktionierung von Synaptosomen.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	0,32 M Sucrose 5 mM HEPES Puffer pH 7,4 Complete™ Protease Inhibitor ddH ₂ O
Puffer B	0,32 M Sucrose 5 mM TRIS/ HCl pH 8,1 ddH ₂ O
1 M Sucrose	1 M Sucrose 5 mM TRIS/ HCl pH 8,1 ddH ₂ O
1,2 M Sucrose	1,2 M Sucrose 5 mM TRIS/ HCl pH 8,1 ddH ₂ O

Der gesamte Hippocampus (durchschnittliches Gewicht eines adulten Hippocampus liegt bei ca. 30 mg) wurde zur Homogenisierung in ein 2 ml Glasröhrchen mit 600 µl eiskaltem Puffer A inklusive Protease Inhibitor überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines Dounce Gewebehomogenisators (KIMBLE®). Hierbei handelt es sich um eine Glaskonstruktion mit zwei unterschiedlichen Pistillen, wobei der Pistill mit großem Abstand (Pistill A) für die initiale Probenreduktion und der Pistill mit kleinem Abstand (Pistill B) zur Herstellung des finalen Homogenats verwendet wird. Zur einheitlichen Verarbeitung der verschiedenen Hippocampi wurden stets 3 Hübe mit Pistill A und 10 Hübe mit Pistill B durchgeführt. Das Homogenat wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet P1 enthielt Nuclei und Zelltrümmer und wurde verworfen oder für DNA-Analysen verwahrt. Der vorsichtig abgenommene Überstand S1 wurde nun für 20 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand S2

enthielt Mikrosomen und cytosolische Bestandteile und wurde nicht weiter prozessiert. Das gewonnene Pellet P2 enthielt die „crude“ Membranfraktion, also die sogenannten unverarbeiteten Membranfraktionen, in welchen auch die Synaptosomen enthalten sind. Um nun aus diesem Gemisch aus Synaptosomen, Myelin und Mitochondrien die Synaptosomale Fraktion zu isolieren, wurde das Pellet P2 in 100 µl Puffer B resuspendiert und auf einen Sucrose-Gradienten pipettiert. Da die einzelnen Bestandteile der crude Membranfraktion eine unterschiedliche Dichte aufweisen, kann man sie anhand eines Dichtegradienten auftrennen. Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren von Partikeln anhand der Sedimentation in einem Dichtegradienten. Verschiedene gelöste Moleküle werden hierbei in einer Ultrazentrifuge anhand ihrer Bewegungsgeschwindigkeit oder Dichte unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte anhand eines Konzentrationsgradienten sortiert. Der Konzentrationsgradient wird erzeugt, indem das Zentrifugenglas von unten nach oben mit einem ansteigenden Gradienten einer Lösung, in diesem Fall eine Sucrose-Lösung, gefüllt wird.

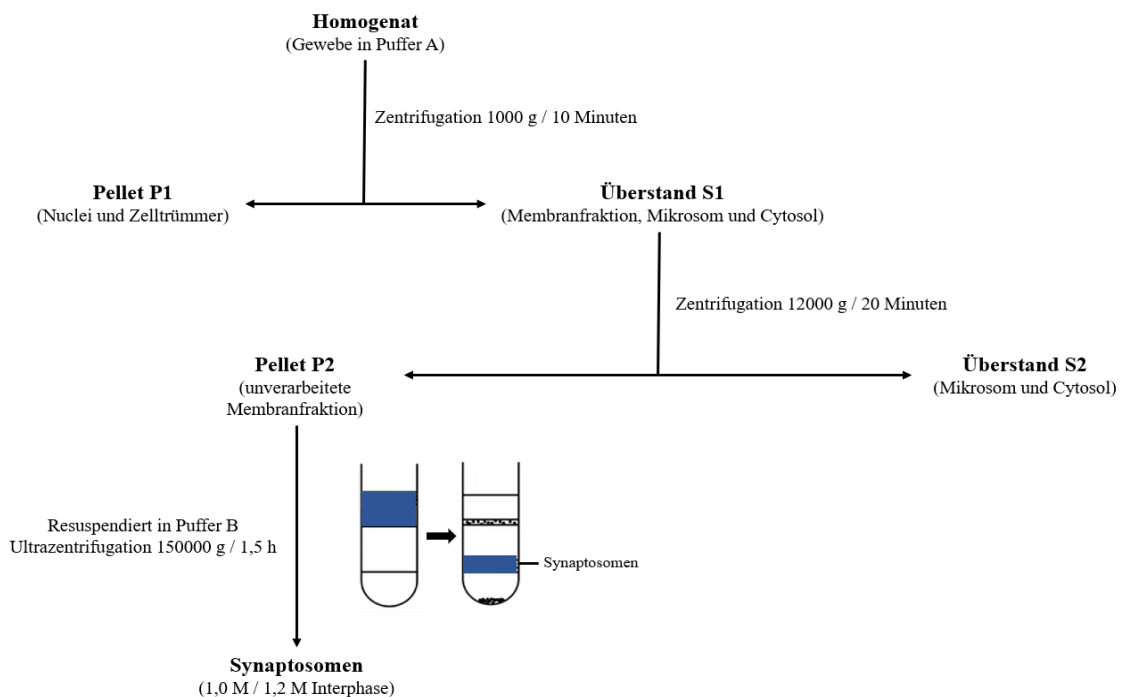


Abbildung 28: Workflow für die Isolation von Synaptosomen aus hippocampalen Homogenaten.

Die synaptosomale Fraktion wurde hierbei in der Interphase der 1,0 M und der 1,2 M Sucrose-Lösung erwartet. Hierfür wurde zuerst 1 ml der 1,0 M Sucrose Lösung in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, 344093) pipettiert. Im Anschluss wurde sehr vorsichtig 1 ml der 1,2 M Sucrose Lösung unterlegt; hierbei sollte darauf geachtet

werden, dass sich die beiden Lösungen nicht vermischen. Nach dem Pipettieren sollte die Grenzschicht (Interphase) klar erkennbar sein. Die zu untersuchende Probe wurde vor der Zentrifugation auf die Oberfläche des Gradienten pipettiert und sollte sich aufgrund ihrer geringeren Dichte von 0,32 M nicht mit der darunterliegenden Phase vermischen. Die fertig pipettierten Röhrchen wurden vor der Zentrifugation auf der Feinwaage gewogen, um ein genaues ausbalancieren während der Ultrazentrifugation zu gewährleisten. Die befüllten Ultrazentrifugenröhrchen wurden in einen vorgekühlten Rotor mit ausschwingenden Röhrchenhaltern (SW 60 Ti E20117 Swinging-Bucket Rotor, Beckman Coulter) platziert und bei 150000 g für 1,5 Stunden bei 4°C in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) zentrifugiert. Der Rotor wird ungebremst auslaufen gelassen, um den Dichtegradienten nicht zu verwirbeln. Nach der Zentrifugation sollte eine etwas dickere, trübe Interphase zwischen den beiden Sucrose-Lösungen erkennbar sein – diese ist die synaptosomal angereicherte Fraktion (vgl. Abb. 29).

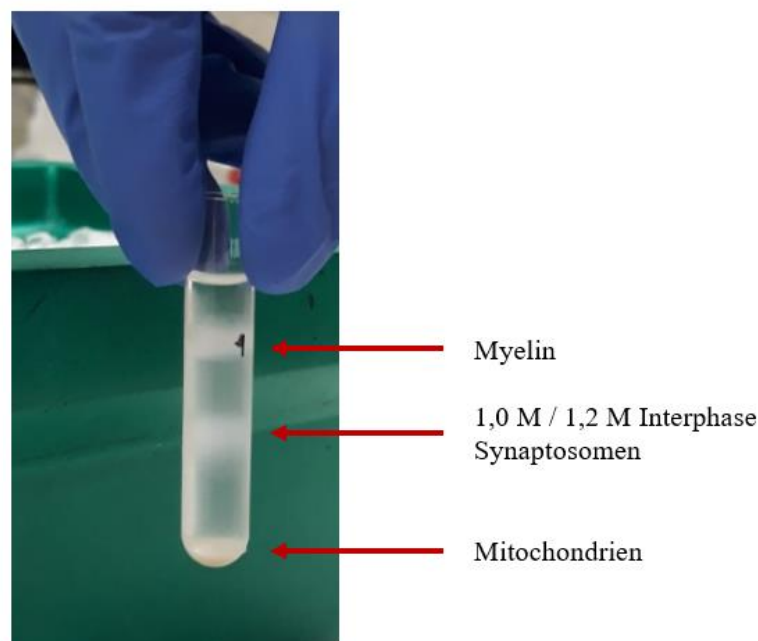


Abbildung 29: Separation der Membranfraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. Nach eineinhalbstündiger Ultrazentrifugation ist die synaptosomale Fraktion in der 1,0 M / 1,2 M Interphase erkennbar. Das Pellet besteht hauptsächlich aus Mitochondrien, wohingegen das Myelin über der 1,0 M Sucrose-Lösung zu finden ist.

Die Interphase wurde vorsichtig herauspipettiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 Minuten bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, um die restliche Sucrose zu

entfernen. Das Pellet wurde entweder bei -80°C gelagert oder für Proteinanalysen (2.2.2.1.9 oder 2.2.2.1.11) weiterverwendet.

2.2.2.1.6 Isolation von Synaptosomen aus Gewebe mittels Syn-Per™ Reagenz

Murine Gehirne wurden nach cervicaler Dislokation möglichst schnell entnommen und die entsprechenden Areale auf Eis präpariert. Die zu untersuchenden Hirnareale wurden zunächst gewogen, um die Menge der einzusetzenden Puffer zu kalkulieren. Die verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 18 einzusehen. Alle Puffer und Materialien wurden während der Fraktionierung bei $0-4^{\circ}\text{C}$ gekühlt bzw. alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Das Protokoll zur Isolation von Synaptosomen erfolgte analog zum Hersteller Protokoll (Thermo Scientific™).

Dabei wurde der gesamte Cortex zur Homogenisierung in ein 2 ml Glasröhrchen mit 700 μl eiskaltem Syn-Per™ Reagenz inklusive Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail (im Verhältnis 1:100) homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines Dounce Gewebehomogenisators (KIMBLE®). Hierbei handelt es sich um eine Glaskonstruktion mit zwei unterschiedlichen Pistillen, wobei der Pistill mit großem Abstand (Pistill A) für die initiale Probenreduktion und der Pistill mit kleinem Abstand (Pistill B) zur Herstellung des finalen Homogenats verwendet wird. Zur einheitlichen Verarbeitung der verschiedenen Hippocampi wurden stets 3 Hübe mit Pistill A und 10 Hübe mit Pistill B durchgeführt. Das Gemisch wurde anschließend in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei 1200 g und 4°C zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet P1 enthielt Nuclei und Zelltrümmer und wurde verworfen oder für DNA-Analysen verwahrt. Vom vorsichtig abgenommenen Überstand S1 wurde die Hälfte als „Homogenat“ abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert, die andere Hälfte wurde nun für 20 Minuten bei 15000 g und 4°C zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand S2 enthielt Mikrosomen und cytosolische Bestandteile und wurde nicht weiter prozessiert. Das gewonnene Pellet P2 enthielt die „crude“ Membranfraktion, also die sogenannten unverarbeiteten Membranfraktionen, in welchen auch die Synaptosomen enthalten sind. Dieses wurde in einem entsprechenden Volumen eiskaltem Syn-Per™ Reagenz inklusive Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail (im Verhältnis 1:100) resuspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.2.2.1.7 Fraktionierung des globulären und filamentösen Aktins

Das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis wurde mittels Western Blotting bestimmt (nachfolgendes Kapitel). Die beiden Aktinformen unterscheiden sich dadurch, dass F-Aktin unlöslich ist, während G-Aktin löslich ist. Zur Fraktionierung der beiden löslichen und unlöslichen Bestandteile wurde der Hippocampus von heterozygoten *Tsc2*-Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren isoliert, in kaltem Lysepuffer (Tabelle 19)

homogenisiert und 30 Minuten lang bei 15000 g zentrifugiert. Das lösliche Aktin (G-Aktin) wurde im Überstand gemessen. Das unlösliche F-Aktin im Pellet wurde in Lysepuffer plus einem gleichen Volumen Puffer 2 (Tabelle 19) resuspendiert und 1 Stunde lang auf Eis inkubiert, um F-Aktin in lösliches G-Aktin umzuwandeln, wobei alle 15 Minuten vorsichtig gemischt wurde. Die Proben wurden 30 Minuten lang bei 15000 g zentrifugiert und das F-Aktin im Überstand gemessen. Die Proben der Überstands- (G-Aktin) und Pelletfraktion (F-Aktin) wurden proportional beladen und durch Western Blotting mit einem spezifischen Aktin-Antikörper analysiert (Sigma) analysiert (siehe Kapitel 2.2.2.1.10).

Tabelle 19: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Fraktionierung von Aktin.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	10 mM K ₂ HPO ₄ 100 mM NaF 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 0,2 mM DTT 0,5% Triton X-100 1 mM Saccharose, pH 7,0 ddH ₂ O
Puffer 2	1,5 mM Guanidinhydrochlorid 1 mM Natriumacetat 1 mM CaCl ₂ 1 mM ATP 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 ddH ₂ O

2.2.2.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die gewünschten Proteine zu untersuchen, wurden diese mittels SDS-Page aufgetrennt und anschließender Western Blot-Analyse quantifiziert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurden ausschließlich SDS-Gele nach der Methode von Laemmli (LAEMMLI & U., 1970) verwendet. Hierfür wurde ein 10 %-iges Trenngel entsprechend der Tabelle 21 vorbereitet und in die Elektrophorese-Apparatur überführt. Um eine korrekte Polymerisation des Gels gewährleisten zu können,

wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das vorbereitete Sammelgel (Tabelle 21) auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm in das Sammelgel eingeführt. Zur elektrophoretischen Separation wurden 20-30 µg der Proteinproben (maximal 25 µl) mit 5 µl Laemmli sample Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach dem Aushärten des Sammelgels und der Entfernung des Kamms wurden die Proteinproben in die Taschen aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurde ein Größenmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für etwa 60 Minuten.

Tabelle 20: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der SDS-Page.

Puffer	Zusammensetzung
Laemmli sample Puffer	2x MagicMix 0,004% Bromphenolblau
10% APS	1 g Ammonium persulfate 10 ml ddH ₂ O
10 % SDS	10 g SDS 90 ml ddH ₂ O
0,5 M Tris pH 6,8	30,275 g Trisbase 400 ml ddH ₂ O konzentriertes HCl zum pH-Wert einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml
1,5 M Tris pH 8,8	90,825 g Trisbase 400 ml ddH ₂ O konzentriertes HCl zum pH-Wert einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml

Tabelle 21: Zusammensetzung der verwendeten Gele bei der SDS-Page.

Komponenten	10% Trenngel [µl]	5% Sammelgel [µl]
ddH ₂ O	1900	1650
1.5 M Tris (pH 8.8)	1300	---
0,5 M Tris (pH 6.8)	---	500
30% Acrylamide	1700	330
10% SDS	50	20
10% APS	50	20
TEMED	2	2

2.2.2.1.9 Western Blot traditionell

Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine wurden die Gele auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran übertragen. Hierfür wurden die TransBlot Turbo Transfer Packs (Biorad) verwendet. Die Western Blot Kammer wurde entsprechend Abbildung 30 aufgebaut und die Proteine für 30 Minuten bei 25 V und 1,2 A auf die Membran transferiert (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System).

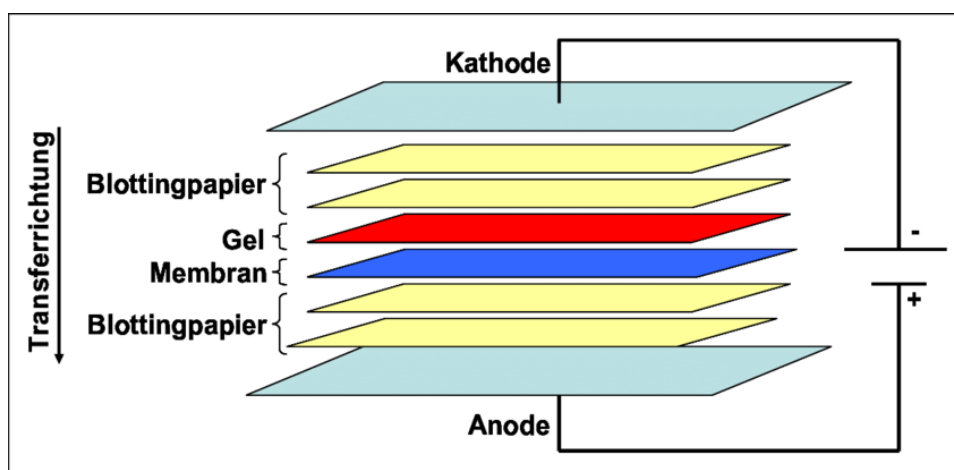


Abbildung 30: Schematischer Aufbau der Western Blot Kammer. Die im Gel aufgetrennten Proteine wandern durch die elektrische Spannung von der Kathode zur Anode und werden so auf die Membran transferiert (Abbildung nach Bruennert 2010).

Tabelle 22: Zusammensetzung der verwendeten Puffer beim Western Blot.

Puffer	Zusammensetzung
PBS-T	1 ml Tween 2 PBS-Tabletten auf 1 Liter ddH ₂ O
Blocking Reagenz / 5 % Milch	2,5 g Milchpulver 50 ml PBS-T
Blocking Reagenz / 1 % BSA	0,5 g Milchpulver 50 ml PBS-T
Blocking Reagenz / 5 % BSA	2,5 g BSA 50 ml PBS-T

Tabelle 23: Verwendete primäre Antikörper beim Western Blot.

Antikörper	Größe	Spender	Verdünnung	Blocking Reagenz
Aktin	42	Hase	1:3000	5% Milch
Akt	60	Hase	1:1000	5% Milch
GABA A alpha1	52	Hase	1:1000	5% Milch
GABA B R1	108	Maus	1:500	5% Milch
GABA B R2	105	Hase	1:500	5% Milch
GluN2a	180	Hase	1:500	5% BSA
GluR1	100	Hase	1:1000	5% Milch
GluR2	100	Hase	1:1000	5% Milch
Neurexin 1	~ 160	Hase	1:500	5% Milch
Neuroigin 2	~100	Maus	1:500	5% Milch
Neuroigin 3	~120	Maus	1:500	5% Milch
pAkt	60	Hase	1:1000	5% Milch
pS6	30	Hase	1:1000	1% BSA
S6	30	Maus	1:1000	1% BSA
Tsc2	200	Hase	1:1000	5% BSA

Nach dem Blotten wurde die Membran in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und entweder in 5 % Milchpulver in PBS-T (nicht-phosphorylierte Proteine) oder 1-5 % BSA in PBS-T (phosphorylierte Proteine) für 30 min geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren (siehe Tabelle22). Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C im entsprechenden Blockingpuffer in der jeweiligen Antikörperkonzentration (siehe Tabelle 23). Nach drei zehnmütigen Waschschrinen auf dem Rollenmischer mit 10 ml PBS-T wurde der sekundäre Antikörper in 3 ml Blocking Reagenz zusammen mit den Membranen inkubiert (siehe Tabelle 2.15 und 2.17). Nach weiteren Waschschrinen wurden die gesuchten Proteine mittels einer Elektrochemilumineszenzreaktion (Western Lightning® Plus ECL Kit) und dem ChemiDoc™ MP System visualisiert. Die Quantifizierung der Banden wurde mit Hilfe der beiden Software Image Lab (Biorad) und Microsoft Excel, vollzogen. Hierbei wurden alle über eine Division durch die korrespondierenden *GAPDH*-Werte normalisiert.

2.2.2.1.10 Kapillarbasiertes und automatisiertes Western Blotting

Das kapillarbasierte und automatisierte Western Blotting mittels Wes (Protein Simple/ Biotechne) wurde analog zum Herstellerprotokoll durchgeführt. Verwendet wurde das

12-230 kDa Wes separation module (#SM-W004) in Kombination mit dem Total Protein Detection Module (#DM-TP01-1). Analysiert und ausgewertet wurden die Daten mit der zugehörigen Software Compass for Simple Western (Protein Simple/ Biotechne).

2.2.2.1.11 Proteomik

Die Proteomik umfasst die Erforschung der Gesamtheit aller in einer Zelle unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine, welche mittels Massenspektrometrie untersucht werden können. Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Proteinen und posttranslationaler Modifikationen. Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Grundsätzlich werden hier die Probenmoleküle mit Hilfe einer Ionenquelle ionisiert und beschleunigt, die generierten Ionen in einem Massenanalysator nach ihrem Masse/ Ladungszahl-Verhältnis aufgetrennt und die einzelnen Ionen sowie deren Intensität durch einen Detektor registriert. Letztlich werden die enthaltenen Daten mit einer entsprechenden Datenbank abgeglichen.

2.2.2.1.11.1 Core Facility Innsbruck

Die massenspektrometrische Analyse der kortikalen Synaptosomproben wurde in Kooperation mit (Institut für Biochemie, Innsbruck) und der Core Facility der medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt. Der Datensatz wurde in Mainz weiter prozessiert und analysiert durch (Institut für Humangenetik, Mainz).

Für die Quantifizierung durch Massenspektroskopie wurde das Programm Proteome Discoverer 2.2 (Suchmaschine Sequest) von Thermo-Fisher Scientific zur Auswertung der Massenspektroskopiedaten verwendet, wobei die iTRAQ-Methode für die Analyse eingesetzt wurde. Bei dieser Methode werden die Wildtyp- und *Tsc2*^{+/-}-Proben mit unterschiedlichen Reagenzien derivatisiert und dann gemeinsam gemessen und ausgewertet. Die gepoolten Proben bzw. Peptide werden im Massenspektrometer detektiert, so dass gleiche Peptide gleichwertige Signale erzeugen. Peaks der gleichen Größe werden gruppiert. In einem zweiten Schritt werden die Marker jeder Peptidgruppe chemisch verdaut - die Marker fallen chemisch aus. Diese Ausfällung wird erneut detektiert. Als Ergebnis werden Marker des Wildtyps und Marker der *Tsc2*^{+/-}-Tiere mit unterschiedlichen Ausfällungsgraden detektiert [Unwin, 2010]. Diese werden in Relation gesetzt und es kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Peptid in heterozygoten *Tsc2*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp über- oder unterexprimiert vorliegt.

Die einzelnen Peptide werden Proteingruppen zugeordnet und führen letztlich zur Auswertung der massenspektroskopischen Analyse. Hierfür werden weitere Parameter

berechnet, unter anderem der PEP-Score. Der PEP-Score ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptid (PSM-Peptid-Spektralübereinstimmung) korrekt ist. Der Sequest-Score ist eine Berechnung, bei der jedes Peptid für ein bestimmtes Protein bewertet und summiert wird. Grundsätzlich gilt: Je höher die Punktzahl, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein falsches Positiv vorliegt. Um eine hohe Rate falsch positiver Peptide zu reduzieren, wurden nur Peptide mit einem Summen-PEP-Score von 10 oder höher berücksichtigt. Um die jeweilige Klassifizierung der synaptischen Proteine als prä- oder postsynaptisch zu bestimmen, wurden Proteinlisten der jeweiligen Kategorie heruntergeladen und mit den eingegebenen Proteindaten verglichen. Die Proteinlisten stammen aus der SynaptomeDB [SynaptomeDB]. Darüber hinaus wurde eine Gene Ontology Enrichment Analysis mit WebGESTALT (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) durchgeführt.

2.2.2.1.11.2 Core Facility für Massenspektrometrie und Quantitative Proteomanalytik in Mainz

Die massenspektrometrische Analyse der hippocampalen Synaptosomproben im Alter von 8-10 Monaten wurde in Kooperation mit der Core Facility für Massenspektrometrie der Universitätsmedizin Mainz () durchgeführt.

Die zu untersuchenden Homogenate und Synaptosomen aus Hippocampi von 8-10 Monate alten *Tsc2*^{+/-}- Tieren und wildtypischen Geschwistertieren wurden wie in 2.2.2.1.5 beschrieben vorbereitet. Zur Analyse der Homogenate wurden 10 µl des initialen Homogenats (vgl. 2.2.2.1.5) und für die Synaptosomen die Pellets aus der Interphase nach Ultrazentrifugation verwendet. Die Prozessierung der Rohdaten sowie die Datenbanksuche zur Identifikation der Peptide und Proteine erfolgte mithilfe einer kommerziellen Software (Protein Lynx Global Server, „PLGS“, version 3.0.2 Firma Waters; Datenbank: UniProtKB Referenzproteom Spezies Maus/Mus musculus). Die anschließende Proteinquantifizierung wurde mit dem ISOQuant Softwarepaket durchgeführt (Distler et al., 2014, 2016). Hierfür wurde die sogenannte Top3-Methode benutzt, bei der die Proteinabundanz über die durchschnittliche Signalintensität der drei meist abundanten Peptide des jeweiligen Proteins berechnet wird (Silva et al., 2006).

3 Ergebnisse

Mutationen in einzelnen Genen können zu syndromalen Formen von Autismus und geistiger Behinderung führen. Patienten mit Tuberöser Sklerose entwickeln meist Symptome entlang einer Zeitskala, welche abhängig von der Mutation ist. Die klinische Variabilität ist hoch und nicht alle Patienten zeigen das gesamte Spektrum der Symptome. Wir vermuten, dass in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation und der individuellen Ausprägung die homöostatische Regulation im Gehirn von Patienten überbeansprucht ist, was zur Entwicklung von Krankheitssymptomen führen kann.

Die meisten publizierten Studien wurden bisher ausschließlich zu einzelnen Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der Symptomentwicklung und die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen im Laufe der Zeit weitestgehend vernachlässigt.

Aufbauend auf der Hypothese, dass es sich bei der Entstehung der Verhaltensanomalien und den zugrundeliegenden molekularen Ursachen um dynamische und homöostatische Prozesse handelt, haben wir eine phänotypische Längsschnittanalyse eines konventionellen heterozygoten *Tsc2*-Mausmodells untersucht, um die Abfolge zellulärer und synaptischer Prozesse zu charakterisieren, welche der Ausprägung des pathologischen Phänotyps in den verschiedenen Verhaltensdomänen zugrunde liegen. Ergänzend zu den *in vivo* Studien wurden erweiterte Proteinexpressionsanalysen im Gehirn auf zellulärer und synaptischer Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten der Hirnentwicklung durchgeführt. Auf Basis dieser Ergebnisse und in Abgleich mit bereits publizierten Erkenntnissen wurden Ansätze zur Wiederherstellung bzw. Verminderung der kognitiven Defizite erarbeitet und in unserem heterozygoten *Tsc2*-Mausmodell experimentell angewandt.

3.1 Phänotypische Längsschnittanalyse eines heterozygoten Mausmodells für Tuberöse Sklerose

Mausmodelle mit Mutationen in *Tsc1* oder *Tsc2* weisen ein ähnliches phänotypisches Profil wie menschliche Patienten auf, einschließlich ASD-ähnlichem Verhalten und kognitiver Beeinträchtigung (Ehninger et al., 2008b; Goorden et al., 2007b; Tang et al., 2014a). In Analogie zur Tuberösen Sklerose beim Menschen, wo sich ASD und ID im Laufe der Zeit entwickeln, führten wir eine Längsschnittanalyse bei heterozygoten *Tsc2*-Männchen durch.

3.1.1 Entwicklung Autismus-ähnlicher Verhaltensmuster ab einem Alter von 2 Monaten

Eine Kohorte männlicher *Tsc2^{+/-}* Mutanten sowie deren wildtypische Geschwister durchliefen erstmals im Alter von 2 Monaten die Verhaltensbatterie (siehe 2.2.1.4). In diesem Alter gelten die Mäuse bereits als Erwachsenen und die Gehirnentwicklung ist nahezu abgeschlossen. Während die *Tsc2^{+/-}* Männchen in dieser Altersstufe keine signifikanten Auffälligkeiten in ihrem Sozialverhalten sowie der Kognition gegenüber ihren wildtypischen Geschwistern aufwiesen (Daten stammen aus der Dissertation von Annabelle Arlt (Arlt, 2019)), konnten bereits Aberrationen in der Körperpflege festgestellt werden.

3.1.1.1 Körperpflege

Die Dauer der Körperpflege erlaubt eine Aussage über repetitives und stereotypisches Verhalten. Hierbei wurde ein 15-minütiger Assay anhand eines Putzmusters, beschrieben von Smolinsky et.al (2009), hinsichtlich elliptischer, einseitiger und beidseitiger Streichbewegungen ausgewertet. *Tsc2^{+/-}* Männchen verbrachten bereits im Alter von 2 Monaten signifikant mehr Zeit mit ihrer Körperpflege als ihre wildtypischen Geschwister (Abb. 31 A). Diese repetitiven Verhaltensmuster konnten darüber hinaus auch in den älteren Kohorten im Alter von 3-4 Monaten (Abb.31 B) sowie im Alter von 8-10 Monaten (Abb.31 C) mit einer hohen Signifikanz festgestellt werden. Es ist bereits bekannt, dass ein erhöhtes Putzverhalten in Mäusen als Autismus-ähnliche Verhaltensweise gewertet werden kann (Peça et al., 2011), weswegen hier rückgeschlossen wird, dass die erhöhte repetitive Körperpflege bei *Tsc2^{+/-}* Mutanten auf einem Autismus-ähnlichen Phänotypen basiert, und dies der am frühesten in der Entwicklung auftretende bisher nachgewiesene pathologische Phänotyp in diesem heterozygoten Mausmodell ist.

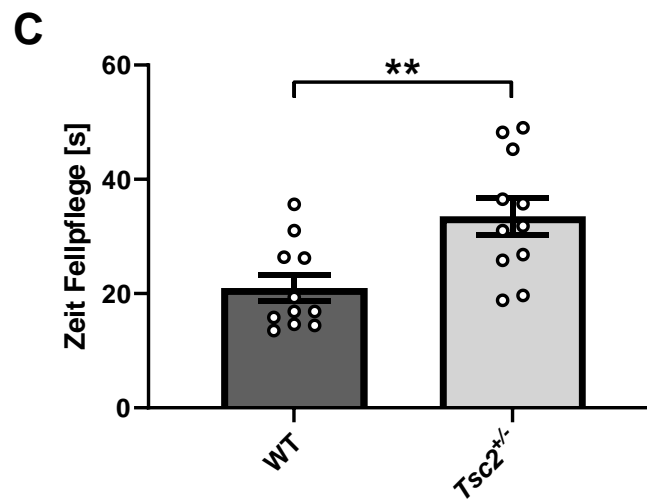
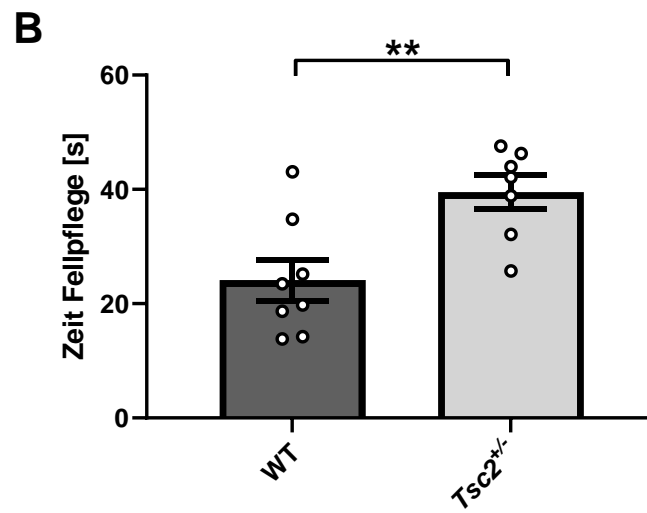
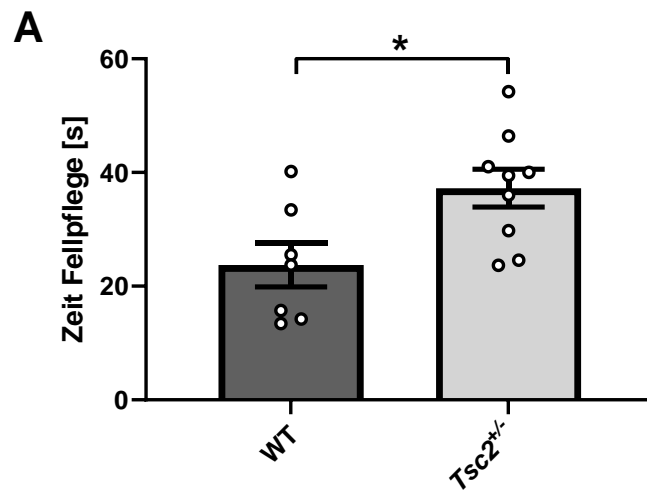


Abbildung 31: Erhöhtes repetitives Fellpflege-Verhalten in $Tsc2^{+/-}$ Mäusen ab einem Alter von 2 Monaten. Mutanten zeigen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern eine erhöhte Fellpflege beginnend im Alter von 2 Monaten (A), welche ebenfalls im Alter von 3-4 Monaten (B) und auch im höheren Alter von 8-10 Monaten (C) sichtbar ist. Die Zeit, die die Mäuse mit der Fellpflege verbrachten, wurde manuell in einem 15-minütigen Assay gemessen. Sowohl 2 Monate ($P = 0,0191$) als auch 3-4 Monate ($P = 0,0067$) sowie 8-10 Monate alte ($P = 0,0046$) $Tsc2^{+/-}$ Mutanten zeigten im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern ein signifikant erhöhtes Pflegeverhalten. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

3.1.2 Störung des Sozialverhaltens ab einem Alter von 3-4 Monaten

Während im Alter von 2 Monaten noch keine Störung des Sozialverhaltens beobachtet werden konnte (Daten stammen aus der Dissertation von Annabelle Arlt (Arlt, 2019)), konnten anhand einer weiteren unabhängigen Kohorte männlicher $Tsc2^{+/-}$ Mutanten im Alter von 3-4 Monaten erstmals Anomalien im Sozialverhalten festgestellt werden, welche bis ins höhere Alter von 8-10 Monaten bestehen blieben.

3.1.2.1 Ein-Kammer-Test für soziale Interaktion

Der Ein-Kammer-Test für soziale Interaktion ist ein etabliertes Testverfahren, welches Informationen über soziale Defizite liefert und ebenfalls mit Autismus in Verbindung gebracht wird. Die Testmaus hat innerhalb eines zweiteiligen Assays die Möglichkeit, im ersten Teil einen leeren Zylinder zu erkunden, in welchem sich im zweiten Teil eine unbekannte Maus befindet, mit der die Testmaus interagieren kann. Die Zeit der sozialen Interaktionen wird summiert und daraus ein sozialer Interaktions-Index berechnet. Hier zeigten $Tsc2^{+/-}$ Mutanten im Alter von 3-4 Monaten eine signifikante Verringerung des sozialen Interaktionsindex im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern (Abb. 32 A), welche ebenso im Alter von 8-10 Monaten (Abb. 32 B) zu erkennen war.

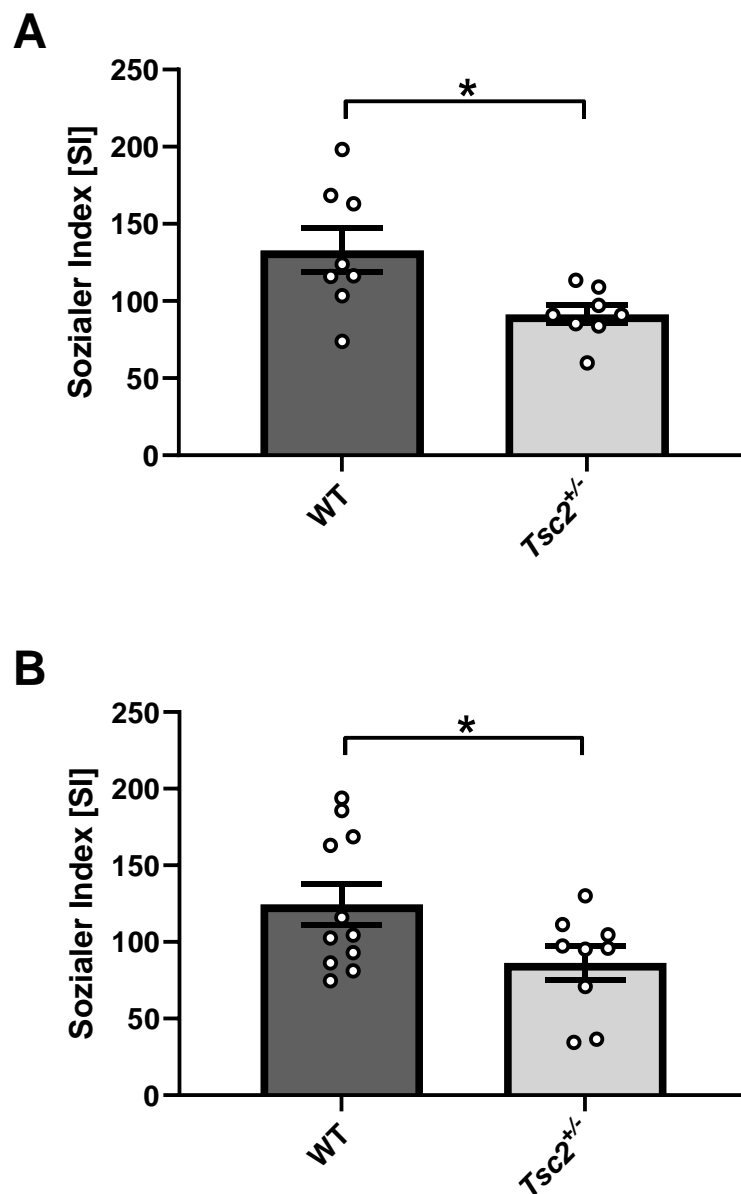


Abbildung 32: Verminderte soziale Interaktion bei *Tsc2*^{+/-} Mäusen ab einem Alter von 3-4 Monaten. Die soziale Interaktion wurde in einem Ein-Kammer-Test in einer neuartigen Umgebung gemessen. Auf eine 5-minütige Gewöhnungsphase mit einem leeren Käfig folgte eine 5-minütige Testphase, in der eine fremde CD1-Maus im Käfig präsentiert wurde. Das automatisierte Video-Tracking wurde verwendet, um die soziale Interaktion zwischen der Testmaus und dem leeren Käfig bzw. der fremden CD1-Maus zu bewerten. *Tsc2*^{+/-} Mutanten zeigten im Alter von 3-4 Monaten (A) ($P = 0,0176$) im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern eine verminderte soziale Interaktionsfähigkeit, die auch im höheren Alter von 8-10 Monaten (B) bestand ($P = 0,0462$). Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

3.1.2.2 Nestbau

Ein ähnliches Muster zeigte sich bei der Bewertung des Nestbaus (Abb. 33). Ein reduzierter Nestbau deutet auf Änderungen des Wohlbefindens oder eine beeinträchtigte Aktivität hin und wird darüber hinaus auch als Maß für soziales Verhalten herangezogen. Der Nestbau wurde anhand einer Skala von Deacon (2006) von 1 bis 5 bewertet, nachdem

die Mäuse für 24 Stunden in einem Käfig ohne Anreicherungsmaterialien die Möglichkeit hatten, aus einem vorab gewogenen Nestlet ein Nest zu bauen. Zusätzlich zu der Score Bewertung wurde das verbrauchte Nestbaumaterial gewogen. Während 2 Monate alte $Tsc2^{+/-}$ Mutanten ebenso wie deren wildtypische Geschwister in der Lage waren, innerhalb von 24 Stunden ein Nest zu bauen, war diese Fähigkeit in 3-4 Monate (Abb. 33 A1) alten sowie auch den älteren 8-10 Monate (Abb. 33 B1) alten $Tsc2^{+/-}$ Männchen nicht zu sehen – hier wurden die Nester der heterozygoten Männchen durchschnittlich mit einem Score von 2 bewertet, was sich signifikant von dem Score von 4 für die Nester der wildtypischen Geschwister unterschied. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 3-4 Monate (Abb. 33 A2) alte sowie auch 8-10 Monate (Abb. 33 B2) alte $Tsc2^{+/-}$ Männchen signifikant weniger Nestbaumaterial verwendeten als ihre wildtypischen Geschwister.

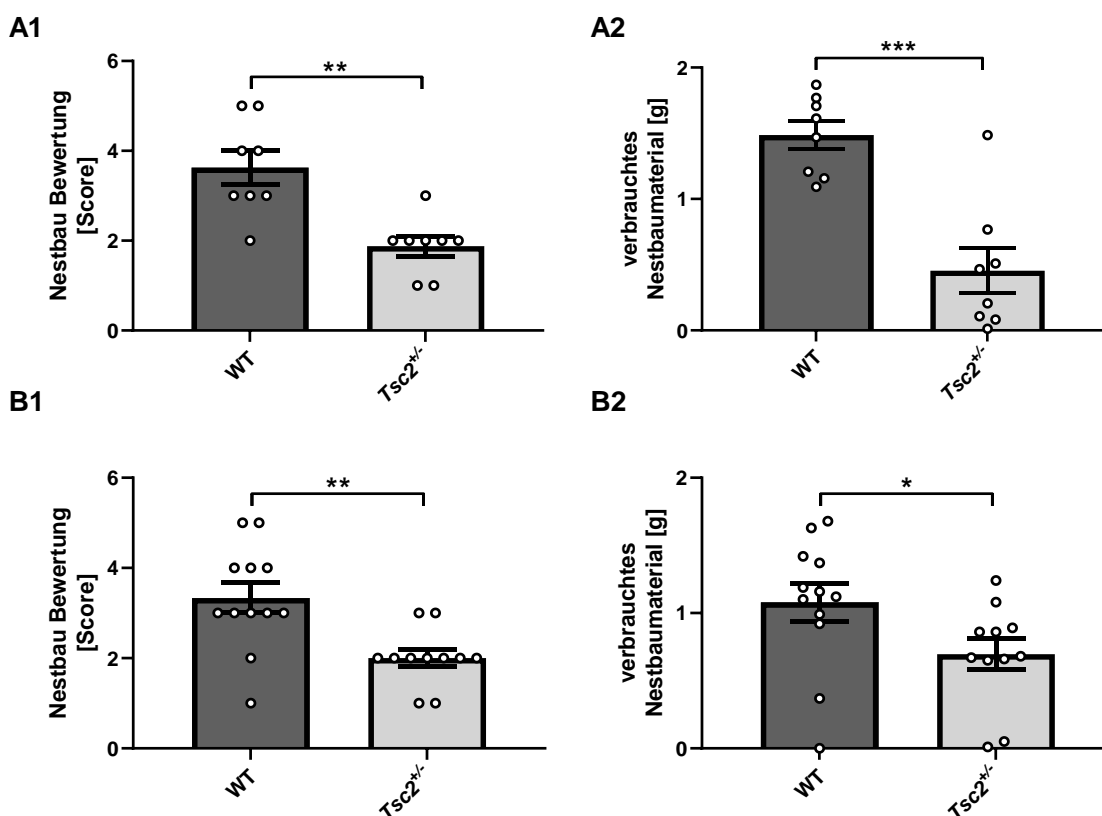


Abbildung 33: Gestörtes Nestbau-Verhalten bei $Tsc2^{+/-}$ Mäusen ab einem Alter von 3-4 Monaten. $Tsc2^{+/-}$ Mutanten zeigen im Alter von 3-4 Monaten (A1) im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern eine Beeinträchtigung des Nestbau Verhaltens ($P = 0,0013$) und verbrauchen signifikant weniger Nestbaumaterial (A2) ($P = 0,0002$). Diese Beeinträchtigung besteht auch im höheren Alter von 8-10 Monaten, sowohl für die Nestbau Bewertung (B1) ($p = 0,0028$) als auch das verbrauchte Material (B2) ($P = 0,0477$). Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

Zusammenfassend konnte anhand des Ein-Kammer-Tests für soziale Interaktion sowie auch im Nestbau-Verhalten gezeigt werden, dass $Tsc2^{+/-}$ Männchen ab einem Alter von

3-4 Monaten Defizite im sozialen Verhalten aufweisen, was wiederum, ähnlich wie das erhöhte Putzverhalten, mit Autismus assoziiert werden kann.

3.1.3 Kognitive Defizite ab einem Alter von 8-10 Monaten

Anders als zuvor in der Literatur beschrieben haben wir in keiner der getesteten Altersgruppen einen Defekt im klassischen Morris-Water-Maze gefunden. Auch ein Test zur Wiedererkennung neuartiger Objekte mit 24 Stunden zwischen Trainings- und Testphase ergab keine Aberrationen bei den *Tsc2*^{+/-}-Mutanten im Vergleich zu deren wildtypischen Geschwistern in allen getesteten Altersgruppen (Daten stammen aus der Dissertation von Annabelle Arlt (Arlt, 2019)).

3.1.3.1 Wiedererkennung neuartiger Objekte nach 7 Tagen

Der Objekterkennungstest ist ein häufig verwendeter Verhaltenstest zur Untersuchung verschiedener Aspekte des Lernens und Gedächtnisses bei Mäusen, bei dem sich die natürliche Neigung von Nagetieren zur Erforschung von Neuheiten zu Nutze gemacht wird. Der Test kann für zahlreiche Anwendungen spezifisch modifiziert werden, indem das Intervall zwischen Trainings- und Testphase entweder verkürzt wird, um das Kurzzeitgedächtnis zu untersuchen, oder verlängert wird, um das Langzeitgedächtnis bzw. die Gedächtniskonsolidierung zu untersuchen.

In einem Test zur Wiedererkennung neuer Objekte mit einer verlängerten Phase von 7 Tagen zwischen Trainingsphase und Testphase konnte bei 8-12 Monate alten *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern eine signifikante Leistungsminderung beobachtet werden (Abb. 34 B1). Darüber hinaus wurde kein Unterschied in der Explorationszeit festgestellt (Abb. 34 B2), womit ausgeschlossen werden kann, dass dem Defekt motorische oder motivationale Aberrationen zugrunde liegen. Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied bei jüngeren Tieren im Alter von 3-4 Monaten gezeigt werden (Abb. 34 A1, A2). Aufgrund der Tatsache, dass der Test zur Wiedererkennung neuartiger Objekte mit 24 Stunden zwischen Trainings- und Testphase keine Aberrationen bei den *Tsc2*^{+/-}-Mutanten ergab, bei einem verlängerten Intervall von 7 Tagen jedoch eine Leistungsminderung in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen festzustellen war, kann hier von einem Konsolidierungsdefekt ausgegangen werden, welcher sich erst zwischen den beiden Zeitpunkten zu entwickeln scheint.

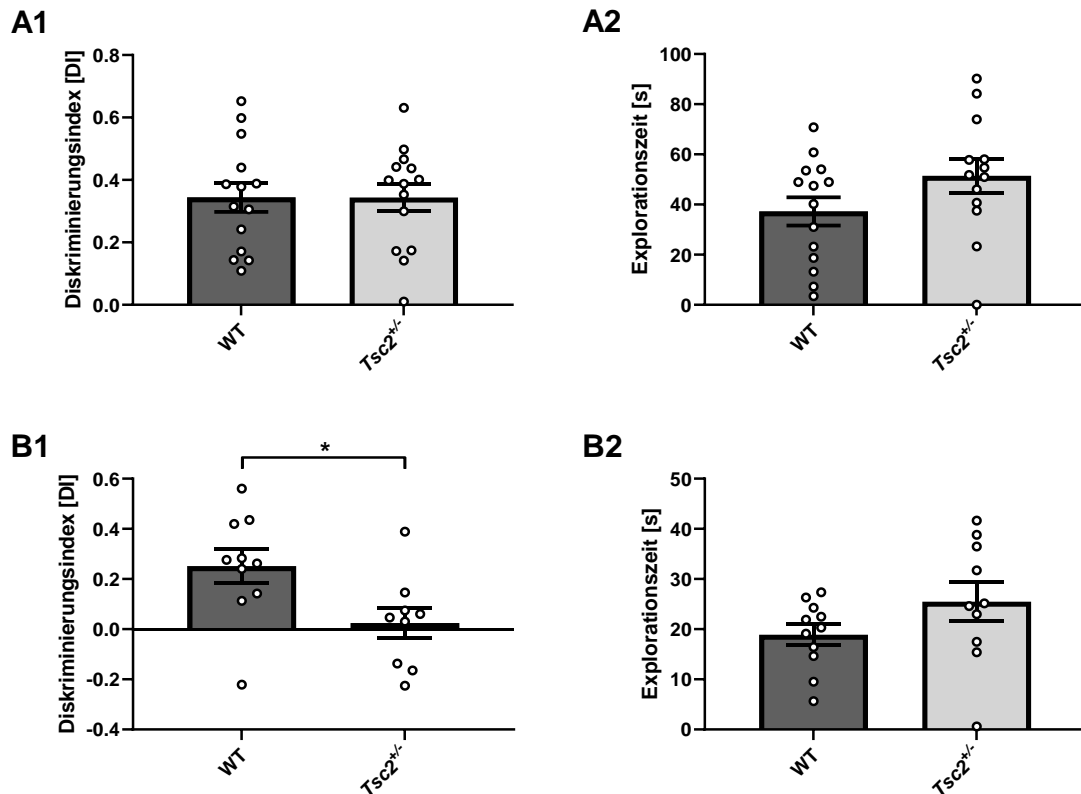


Abbildung 34: Kognitive Einschränkungen in der Wiedererkennung neuartiger Objekte der *Tsc2*^{+/-} Mäuse im Alter von 8-10 Monaten. Die Mäuse durften an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einem 5-minütigen Testansatz ein identisches Objektpaar untersuchen. Nach 7 Tagen wurde ein vertrautes Objekt durch ein neues Objekt ersetzt. Der Diskriminierungsindex (DI) wird berechnet als: (Zeit neuartiges Objekt - Zeit vertrautes Objekt) / (Zeit neues Objekt + Zeit vertrautes Objekt). Während sowohl 3-4 Monate alte *Tsc2*^{+/-} Mäuse als auch wildtypische Geschwister (A1) eine signifikante Präferenz ($P = 0,9941$) für das neue Objekt zeigten, was anhand des gleich hohen Diskriminierungsindex sichtbar ist, zeigten 8-10 Monate alte *Tsc2*^{+/-} Mäuse (B1) keine Präferenz zwischen dem neuartigen und dem vertrauten Objekt im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern ($P = 0,0254$), wie durch den reduzierten DI nach 7 Tagen Pause gezeigt wurde. Dabei gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Explorationszeit der 3-4 Monate alten (A2) ($P = 0,1151$) sowie der 8-10 Monate alten (B2) ($P = 0,1439$) *Tsc2*^{+/-} Mutanten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

3.1.3.2 Episodische Gedächtnisbatterie

Das episodische Gedächtnis als Subkomponente des Langzeitgedächtnisses ist eine weitere Gedächtnisfunktion, die ebenfalls von hippocampal-kortikalen Projektionen sowie dem Hippocampus selbst abhängt. In einer vierwöchigen Testbatterie, die ursprünglich zum Testen des episodischen Gedächtnisses in Ratten etabliert wurde, wurde eine signifikante Leistungsminderung im episodischen Gedächtnistest (Objekt-Ort-Kontext-Erkennungsaufgabe (OPCR)) in 8-12 Monate alten *Tsc2*^{+/-} Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren festgestellt, während die Erkennung neuartiger Objekte (NORT), Objekt-Ort- (OPR) sowie Objekt-Kontext-Konstellationen nicht verändert war (Abb. 35 B). Bei jüngeren 3-4 Monate alten Tieren wurde keine

Beeinträchtigung der Objekt-Ort-Kontext-Erkennung festgestellt (Abb. 35 A). Für alle Einzeltests waren die Explorationszeiten vergleichbar zwischen allen Gruppen.

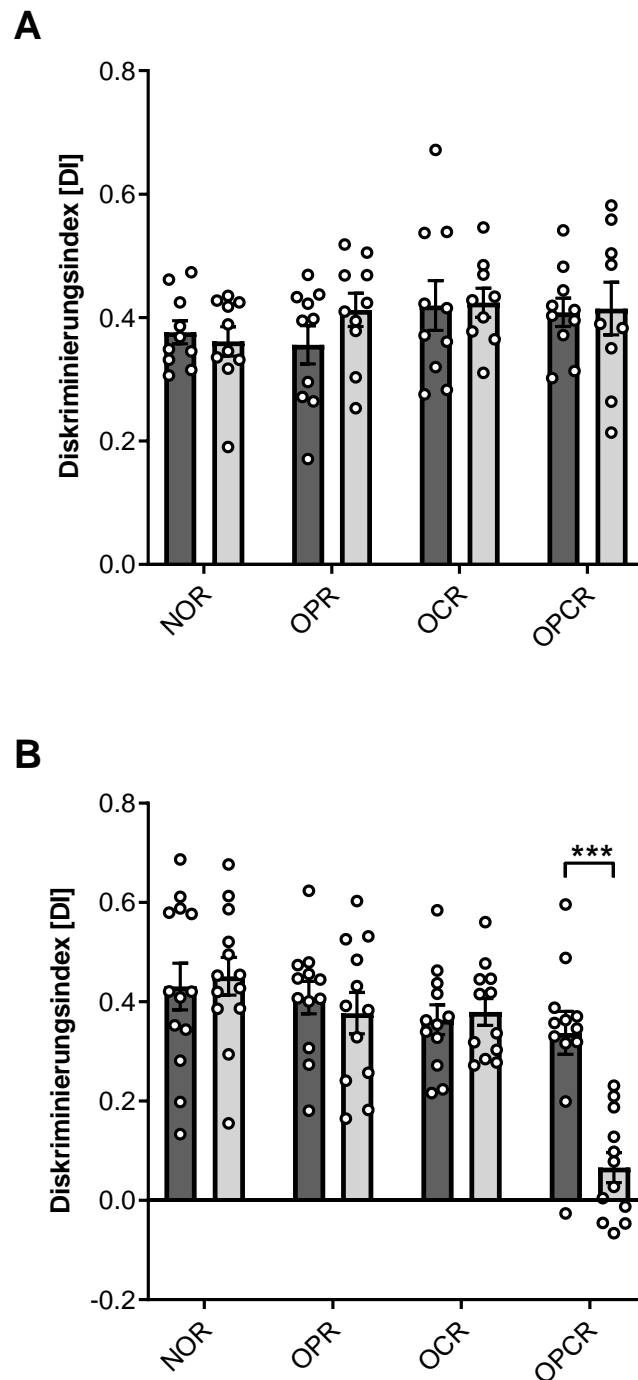


Abbildung 35: Kognitive Einschränkungen des episodischen Gedächtnisses der *Tsc2*^{+/-} Mäuse im Alter von 8-10 Monaten. Die episodische Gedächtnisbatterie besteht aus vier verschiedenen NORT-Ansätzen (NOR, OPR, OCR, OPCR). Die Zeit, die die Mäuse mit den Objekten verbrachten, wurde während einer Testphase von 2,5 Minuten gemessen. Der Diskriminierungsindex (DI) wird berechnet als (Zeit neuartiges Objekt - Zeit vertrautes Objekt) / (Zeit neues Objekt + Zeit vertrautes Objekt). *Tsc2*^{+/-} Mutanten konnten im Alter von 8-10 Monaten (B) ($P = 0,000026$) die Objekt-Ort-Kontext-Erkennungsaufgabe (OPCR) nicht ausführen, während sie in der Lage sind, neuartige Objekte (NOR) sowie Objekt-Ort (OPR) und Objekt-Kontext-Konstellationen (OCR) zu erkennen. *Tsc2*^{+/-} Mutanten im Alter von

3-4 Monaten (A) waren, wie auch ihre wildtypischen Geschwister, in der Lage, in allen vier Tests die neue Objekt-Konstellation zu identifizieren. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

Diese Daten deuten auf einen degenerativen Prozess bei der Gedächtniskonsolidierung und der episodischen Gedächtnisverarbeitung hin und lassen vermuten, dass diese Beeinträchtigungen auf gestörte Projektionen zwischen Hippocampus und Cortex oder auf anatomische Anomalien in alternden *Tsc2*^{+/-} Mutanten zurückzuführen sein könnten.

Zusammenfassend konnte die Längsschnittanalyse des heterozygoten Mausmodells zeigen, dass sich der pathologische Phänotyp stufenweise aufbaut, beginnend mit autistischen Verhaltensmustern wie der übersteigerten Fellpflege im Alter von 2 Monaten, gefolgt von Beeinträchtigungen im Sozialverhalten im Alter von 3-4 Monaten, endend in subtilen kognitiven Störungen der Gedächtniskonsolidierung und des episodischen Gedächtnisses im Alter von 8-10 Monaten (Abb. 36). Diese phänotypische Progression ist ähnlich wie die der menschlichen Patienten mit Tuberöser Sklerose und lässt diese heterozygote Mauslinie als geeignetes Modell zur Untersuchung der Pathologie auf molekularer Ebene beziehungsweise der, dem Phänotypen zugrunde liegenden neurologischen Ursachen erscheinen.

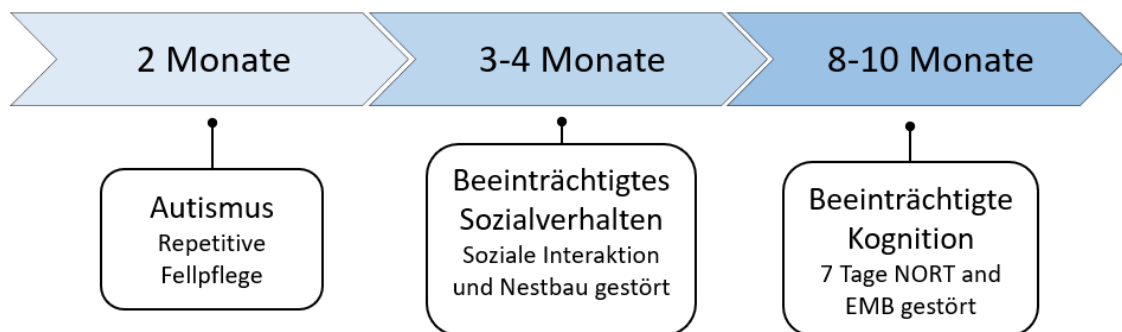


Abbildung 36: Zusammenfassung der phänotypischen Längsschnittanalyse des heterozygoten Mausmodells für Tuberöse Sklerose. Visualisiert wird das progressive Auftreten phänotypischer Auffälligkeiten der *Tsc2*^{+/-} Mutanten, beginnend mit autistischen Verhaltensmustern im Alter von 2 Monaten, gefolgt von Beeinträchtigungen im Sozialverhalten ab einem Alter von 3-4 Monaten und kognitiven Defiziten, die erstmals im Alter von 8-10 Monaten beobachtet werden.

3.2 Entstehung der Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten in jungen *Tsc2*^{+/-} Mäusen und Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen

In diesem Kapitel wird sich ausschließlich auf die Entstehung der Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten und der Untersuchung ihrer zugrunde liegenden molekularen Mechanismen fokussiert. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, treten erste Autismus-ähnliche Auffälligkeiten bereits frühzeitig im Alter von 2 Monaten mit einer erhöhten repetitiven Körperpflege auf, gefolgt von einem gestörten Nestbauverhalten und verminderter sozialer Interaktion im Alter von 3-4 Monaten. In Anlehnung an diese Beobachtungen wurden für die in diesem Kapitel beschriebenen Analysen Zeitpunkte von der Geburt bis zur Entstehung des Autismus-ähnlichen Phänotypen gewählt. Hierfür wurde eine vergleichende Proteomanalyse kortikaler Homogenate und Synaptosomen zu verschiedenen Zeitpunkten von der frühen bis zur späten postnatalen Phase mittels serieller Western Blot- und Massenspektrometrieanalysen durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Entstehung der kognitiven Defizite werden unabhängig davon in Kapitel 3.3 beleuchtet.

3.2.1 Proteinexpression von *Tsc2* in kortikalem Gewebe im Zeitverlauf

Da es sich bei der TS um eine autosomal dominante Erkrankung handelt, welche – wie auch in dem verwendeten Mausmodell – durch eine heterozygote Mutation im *Tsc2*-Gen verursacht wird, würde man vermuten, dass die Proteinexpression um etwa die Hälfte, mindestens aber signifikant reduziert, vorliegt. Bei der Analyse des *Tsc2*-Proteinexpressionsniveaus in primären kortikalen Neuronen (E14.5) sowie in kortikalen Homogenaten zu den Zeitpunkten P10, P17, P25 und 3, 4 und 8 Monaten konnte eine signifikante Reduktion des *Tsc2*-Proteins nur in frühen Stadien detektiert werden. Abbildung 37 zeigt, dass zwischen E14.5 und P17 eine signifikante Reduktion der *Tsc2*-Proteinexpression um etwa 40-60% vorliegt, während ab P25 bis ins Alter von 8 Monaten das Expressionsniveau in den heterozygoten Tieren dem der wildtypischen Kontrollen entspricht. Dies lässt vermuten, dass die Zellen ab P25 in der Lage sind, die mutationsbedingte Reduktion des *Tsc2* Proteins zu kompensieren. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten erst viel später als P17 beobachtet wurden, implizieren diese Daten, dass sich die klinischen Manifestationen in den heterozygoten Mäusen weitestgehend unabhängig vom primären Defekt entwickeln und womöglich eher über eine Störung des neuronalen Netzwerkes verursacht werden.

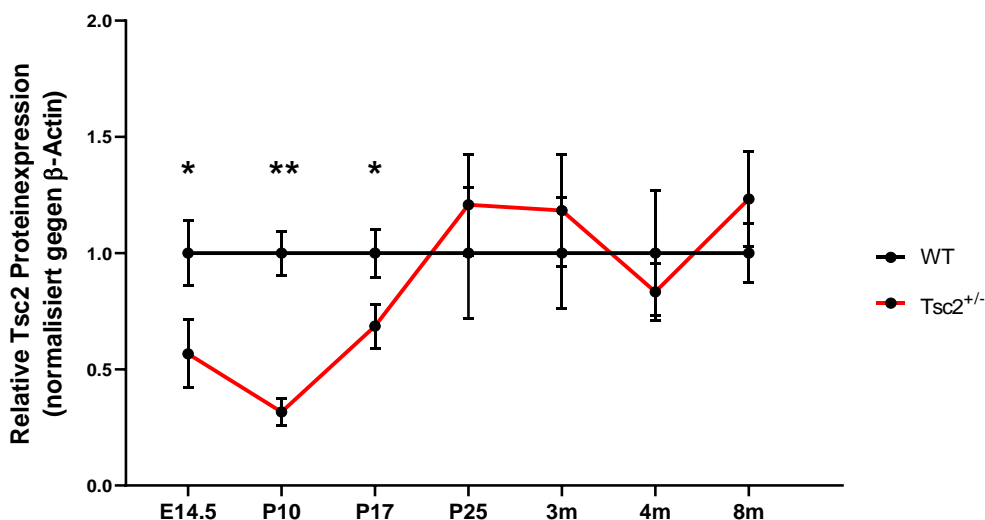


Abbildung 37: Entwicklungsverlauf der Tsc2-Proteinexpression. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der Tsc2-Expression aus primären kortikalen Neuronenkulturen (E14.5) und kortikalen Homogenaten zu den Zeitpunkten P10, P17, P25, 3 Monate, 4 Monate und 8 Monate. Die Tsc2-Proteinexpression ist zu den Zeitpunkten E14,5 ($P = 0.0459$), P10 ($P = 0.0035$) und P17 ($P = 0.0466$) verringert, während die Tsc2-Proteinexpression von P25 bis zum Alter von 8 Monaten auf das WT-Niveau zurückkehrte. Die Werte wurden gegen β -Aktin normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

3.2.2 Proteinexpression der mTOR-Zielgene phospho-S6 und phospho-Akt im Zeitverlauf

Da durch die in unserem Mausmodell vorhandene heterozygote Mutation des *Tsc2*-Gens eine Hyperaktivität des mTOR-Signalwegs erwartet wurde, sollte dies anhand der Proteinexpression des phosphorylierten ribosomalen S6-Proteins sowie auch des phosphorylierten Akt-Proteins mittels serieller Western Blot Analyse untersucht werden. Bei der Analyse des Proteinexpressionsniveaus von Phospho-S6 und Phospho-Akt in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen konnte überraschenderweise und entgegen der Literatur zu keinem Zeitpunkt des Entwicklungsverlaufs eine signifikante Erhöhung im Phosphorylierungsstatus der beiden Proteine festgestellt werden (siehe Abb.38). Allerdings ist die Detektion der Phosphorylierung mittels Western Blot sehr fehleranfällig und die hierfür verwendete Methode ist möglicherweise nicht sensitiv genug, um auf Ebene des gesamten Gewebes die mTOR Hyperaktivität tatsächlich festzustellen.

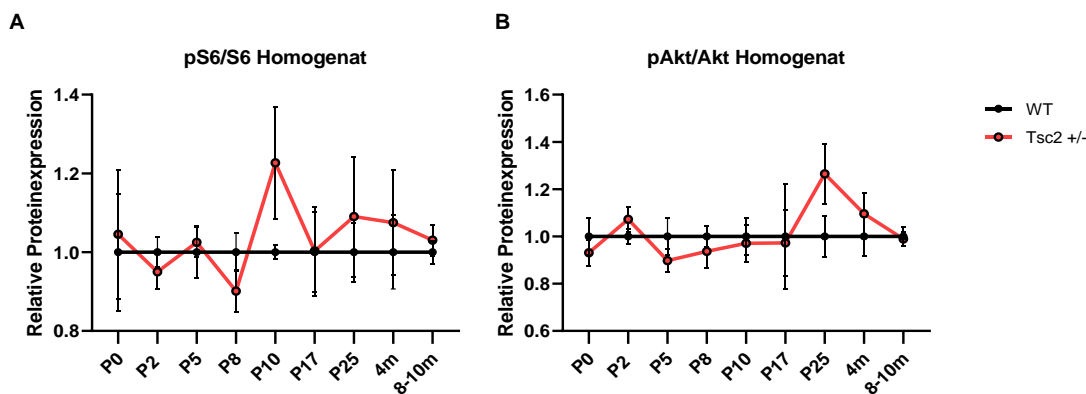


Abbildung 38: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression des phosphorylierten S6-Proteins sowie des phosphorylierten Akt-Proteins, jeweils im Verhältnis zum nicht-phosphorylierten Protein, in kortikalen Homogenaten. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der pS6/S6- (A) sowie pAkt/Akt-(B) Expression zu den Zeitpunkten P0, P2, P5, P8, P10, P17, P25, 4m und 8-10m. Zu keinem Zeitpunkt war die Expression der beiden Proteine signifikant fehlreguliert. Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

3.2.3 Molekulare Dynamik synaptischer Rezeptoren im sich entwickelnden Maushirn

Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand wird vermutet, dass eine Dysregulation synaptischer Rezeptoren und den damit einhergehenden Veränderungen des exzitatorischen/ inhibitorischen Gleichgewichts eine Rolle bei der Entwicklung von ASS spielen können. Maßgeblichen Einfluss kann darauf der mTOR-Signalweg haben, da dieser eine essenzielle Rolle für die lokale Proteinsynthese im postsynaptischen Kompartiment spielt und dadurch die synaptische Plastizität reguliert. Aufgrund der Tatsache, dass die Autismus-ähnlichen Anomalien in unserem heterozygoten Mausmodell keine direkte Folge des primären genetischen Defektes zu sein scheinen, sondern möglicherweise durch Störungen des neuronalen Netzwerks selbst zustande kommen, sollten synaptisch assoziierte Proteine in Hinblick auf deren Proteinexpressionsniveau zu verschiedenen Zeitpunkten während der Hirnentwicklung mittels serieller Western Blot-Analyse untersucht werden.

Kortikale Homogenate und Synaptosomen wurden zu den Zeitpunkten P0, P2, P5, P8, P10, P17, P25, P28 und 3 Monaten isoliert, um möglichst viele Schlüsselzeitpunkte während der Gehirnentwicklung bis zur Ausprägung des autistischen Phänotyps abzudecken. Fokussiert wurde sich auf postsynaptische Rezeptoren, darunter der exzitatorische NMDA-Rezeptor GluN2A, die exzitatorischen AMPA-Rezeptoren GluA1 und GluA2 sowie die inhibitorischen GABA-Rezeptoren GABAA Rezeptoruntereinheit alpha1 (GABAA α 1), GABAB Rezeptor 1 (GABABR1) und GABAB Rezeptor 2 (GABABR2).

Während weder zu Zeitpunkt P0 noch zu P2, weder im Homogenat noch in den Synaptosomen, signifikante Unterschiede zu beobachten waren, waren erste Dysregulationen zum Zeitpunkt P5 sichtbar. Interessanterweise zeigen fast alle untersuchten Proteine zum Zeitpunkt P5 eine signifikante Herunterregulation in den Synaptosomen (außer GluN2A, siehe Abb.39 A2), während die Proteinexpression in den Homogenaten gegenüber den wildtypischen Kontrollen unverändert schien (vgl. Abb 39-41). Somit wird P5 als der erste signifikante Einbruch in der Expression der postsynaptischen Proteine gezählt.

Bis zum zeitlichen Fenster zwischen P17-P25 waren nur wenige weitere Dysregulationen zu beobachten. Zum Zeitpunkt P10 war die einzig signifikante Fehlregulation für den Rezeptor GABABR2 im Homogenat zu erkennen (siehe Abb.41 C1) – alle anderen Proteine zeigten sowohl zu P8 als auch P10 keine Abweichungen zum Wildtyp. Einzig das Verhältnis von der AMPA-Rezeptoren GluA1 zu GluA2 war zum Zeitpunkt P8 fehlreguliert (siehe Abb.40 C2) – hier verschob sich das Verhältnis signifikant in Richtung GluA1.

Der nächste deutliche Einbruch der kortikale Rezeptorregulation war ab P17, vor allem aber zwischen P25-P28 zu erkennen. Während der NMDA-Rezeptor GluN2A zu Zeitpunkt P17 nur in den Synaptosomen herunterreguliert war, war dieser Effekt zu Zeitpunkt P25 im Homogenat zu erkennen, nicht mehr aber in den Synaptosomen. Zu P28 und 3 Monaten war kein signifikanter Unterschied mehr zu sehen, wobei die Tendenz sowohl im Homogenat als auch in den Synaptosomen in Richtung Hochregulation in den *Tsc2^{+/-}* Mäusen ging.

Bei Betrachtung der AMPA-Rezeptoren war eine signifikante Hochregulation im Homogenat ab P25 für GluR2 festzustellen, welche auch zu P28 signifikant und in 3 Monaten mit einem P-Wert von 0.071 knapp nicht signifikant war (siehe Abb. 40 B2). Während GluR2 in den Synaptosomen zu P25 und 3 Monaten nicht fehlreguliert war, war zu P28 auch hier eine signifikante Hochregulation in den *Tsc2^{+/-}* Tieren zu beobachten. GluR1 zeigt ebenso eine signifikante Hochregulation an P28 und 3 Monaten im Homogenat, währenddessen es in den Synaptosomen keine Abweichungen mehr gab (Abb. 40 A1 und A2). Das Verhältnis der beiden AMPA-Rezeptoren war im Homogenat zum Zeitpunkt P25 signifikant in Richtung GluA2 verschoben (Abb.40 C1), währenddessen es in den Synaptosomen eine signifikante Verschiebung in Richtung GluA1 zum Zeitpunkt P17 gab (Abb.40 C2).

Die Auswertung der GABA-Rezeptoren wies ein ähnliches Bild wie das der AMPA-Rezeptoren auf. Während für alle drei GABA-Rezeptoren im Homogenat eine Hochregulation in den heterozygoten Fraktionen erkennbar war (siehe Abb. 41 A1, B1, C1), zeigten die Synaptosomen weniger und vor allem weniger starke Schwankungen. Hier war für GABAA α 1 zu P25 eine signifikante Herunterregulation zu registrieren

Abb.41 A2), während es ab P28 eine bis zu 3 Monaten anhaltende Tendenz in Richtung Hochregulation gab. Während GABABR1 in den Synaptosomen keine weiteren Fehlregulationen mehr zeigte (Abb.41 B2), war GABABR2 zu Zeitpunkt P25 signifikant hochreguliert (Abb.41 C2).

Insgesamt wurden anhand der Trajektorien zwei zeitliche Fenster definiert, in denen es zu bedeutenden Fehlregulationen in der Expression postsynaptischer Rezeptoren kommt: zum ersten um den Zeitpunkt P5 sowie zum zweiten zwischen P17 und P28. Dabei ist festzustellen, dass einige Fehlregulationen bis hin zum Zeitpunkt der Entwicklung der Autismus-ähnlichen Anomalien bestehen blieben. Daraus lässt sich schließen, dass schon früh während der Gehirnentwicklung Fehlregulationen in der Expression postsynaptischer Rezeptoren auftreten, welche zu einer Störung des neuronalen Netzes beziehungsweise des neuronalen Gleichgewichts führen können, was wiederum ursächlich für die Ausbildung des Phänotyps sein könnte. Während die Veränderung einiger Proteine bis zur Entwicklung des Phänotyps scheinbar kompensiert werden können, bleiben manche darüber hinaus existent.

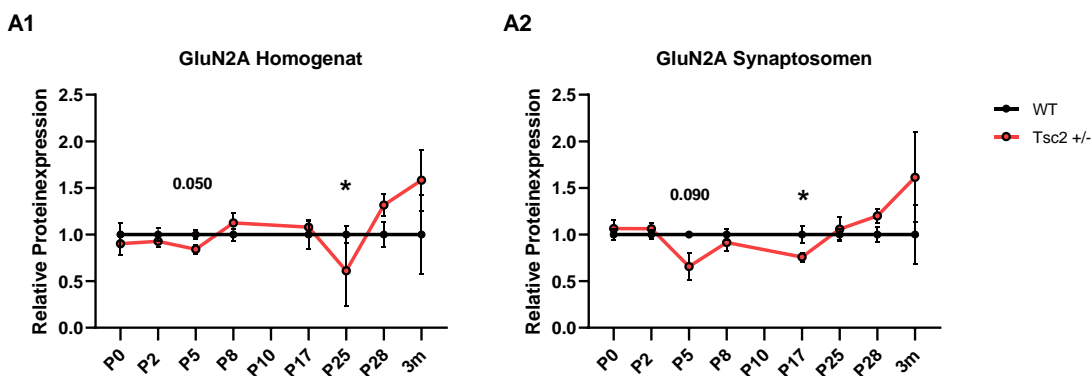


Abbildung 39: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression des NMDA Rezeptors GluN2A in Homogenaten und Synaptosomen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der GluN2A-Expression in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu den Zeitpunkten P0, P2, P5, P8, P10, P17, P25, P28 und 3m. Im Homogenat war die Proteinexpression zum Zeitpunkt P25 signifikant herunterreguliert ($P = 0.0351$) (A1), während in den Synaptosomen zum Zeitpunkt P17 ($P = 0.0373$) ebenfalls eine signifikante Herunterregulation zu verzeichnen war (A2). Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

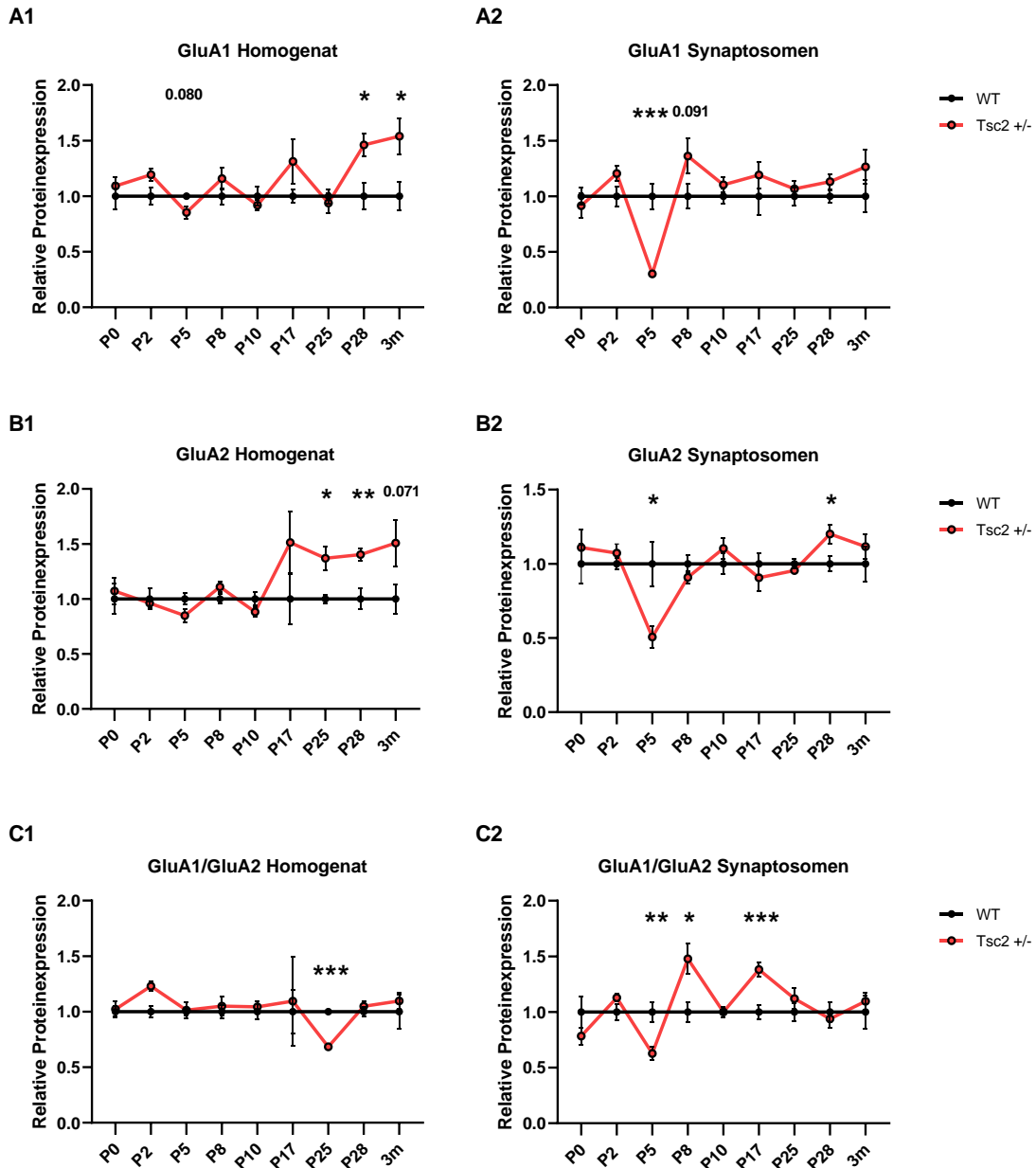


Abbildung 40: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression der AMPA Rezeptoren GluA1 und GluA2 in Homogenaten und Synaptosomen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der GluA1- und GluA2-Expression sowie das Verhältnis der beiden Rezeptoren in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu den Zeitpunkten P0, P2, P5, P8, P10, P17, P25, P28 und 3m. Für GluA1 war die Proteinexpression im Homogenat zum Zeitpunkt P28 ($P = 0.0151$) und 3m ($P = 0.0257$) signifikant hochreguliert (A1), während in den Synaptosomen zum Zeitpunkt P5 ($P = 0.0007$) signifikante Herunterregulation zu verzeichnen war (A2). Für GluA2 war die Proteinexpression im Homogenat zum Zeitpunkt P25 ($P = 0.0437$) und P28 ($P = 0.0047$) signifikant hochreguliert (B1), 3m zeigte hingegen eine Tendenz ($P = 0.071$), während in den Synaptosomen zum Zeitpunkt P5 ($P = 0.0116$) eine signifikante Herunterregulation und zu P28 ($P = 0.0299$) eine signifikante Hochregulation erkennbar war (B2). Das Verhältnis der AMPA-Rezeptoruntereinheiten zueinander war in den Homogenaten an P25 fehlreguliert ($P = 0.0002$) (C1), währenddessen es in den Synaptosomen zu den Zeitpunkten P5 ($P = 0.0082$), P8 ($P = 0.0154$) und P17 ($P = 0.0009$) zu signifikanten Abweichungen zwischen heterozygoten und wildtypischen Fraktionen kam (C2). Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

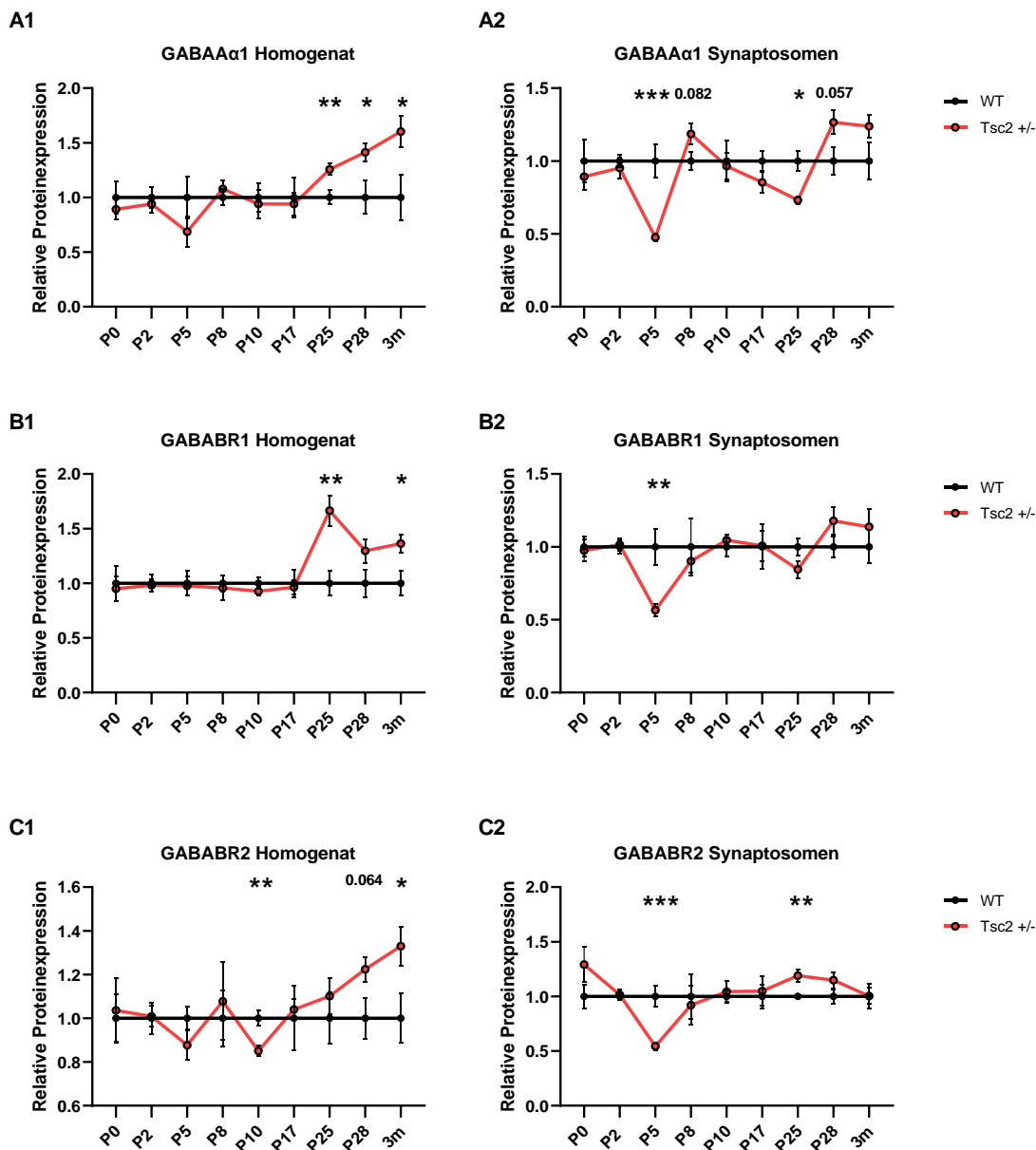


Abbildung 41: Entwicklungsverlauf der Proteinexpression der GABA-Rezeptoren GABAA α 1, GABABR1 und GABABR2 in Homogenaten und Synaptosomen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der GABAA α 1-, GABABR1- und GABABR2-Expression in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu den Zeitpunkten P0, P2, P5, P8, P10, P17, P25, P28 und 3m. Für GABAA α 1 war die Proteinexpression im Homogenat vom Zeitpunkt P25 anhaltend bis 3m ($P = 0.0095$, $P = 0.0377$, $P = 0.0365$) signifikant hochreguliert (A1), während in den Synaptosomen zum Zeitpunkt P5 ($P = 0.0005$) und P25 ($P = 0.237$) signifikante Herunterregulation zu verzeichnen war (A1, A2). Für GABABR1 war die Proteinexpression im Homogenat zu den Zeitpunkten P25 ($P = 0.0030$) und 3m ($P = 0.0299$) signifikant hochreguliert (B1), während in den Synaptosomen zum Zeitpunkt P5 ($P = 0.0040$) eine signifikante Herunterregulation erkennbar war (B2). Für GABABR2 war die Proteinexpression im Homogenat zum Zeitpunkt P10 ($P = 0.0050$) signifikant herunterreguliert, wohingegen ab P25 ein Trend Richtung Hochregulation sichtbar war, welcher in einer signifikanten Hochregulation in 3m resultierte ($P = 0.0434$) (C1). In den Synaptosomen war zum Zeitpunkt P5 ($P = 0.0007$) eine signifikante Herunterregulation erkennbar, wohingegen die Expression an P25 in den heterozygoten Fraktionen wieder hochreguliert vorlag ($P = 0.0040$) (C2). Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

3.2.4 Dysregulation synaptischer- und Autismus-assoziiierter Proteine in der Zeitspanne der Phänotyp-Entwicklung

Die longitudinale Verhaltensanalyse konnte zeigen, dass sich die Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten in einer Zeitspanne zwischen 2 und 3-4 Monaten entwickeln. Da Beeinträchtigungen im Nestbau und der sozialen Interaktion erst deutlich später als die sich im Alter von 2 Monaten entwickelnden Auffälligkeiten in der repetitiven Körperpflege zu beobachten sind, sollten die molekularen Veränderungen innerhalb dieser auffälligen Zeitspanne untersucht werden. Hierfür wurden synaptosomale Fraktionen aus dem Kortex von heterozygoten *Tsc2*-Tieren sowie wildtypischen Geschwistertieren zu einem frühen (P28) und einem späteren Zeitpunkt (3 Monate) biochemisch isoliert und in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von

(Institut für Biochemie, Innsbruck) massenspektrometrisch analysiert. Die Aufarbeitung und Prozession der resultierenden Rohdaten erfolgte anschließend durch (Institut für Humangenetik, Mainz).

Die Auswertung zeigte, dass zum Zeitpunkt P28 551 Proteine unterschiedlich exprimiert vorlagen, von denen 157 synaptisch assoziiert waren. Aus diesen 157 Proteinen konnten 116 dem postsynaptischen und 41 dem präsynaptischen Kompartiment zugeordnet werden (siehe Abb.42 A). Unter diesen differentiell exprimierten Proteinen waren neben GABA-Rezeptor assoziierten Proteinen (unter anderem auch GABABR2), AMPA-Rezeptor assoziierten Proteinen und NMDA-Signalweg-assoziierten Proteinen vor allem auch Neuroligine (Neuroligin-2 und -3) sowie Neurexin-1 in den *Tsc2*^{+/-} - Fraktionen hochreguliert. Die GO-Anreicherungsanalyse ergab, dass etwa 80 der unterschiedlich exprimierten Proteine mit der neuronalen Entwicklung assoziiert sind.

Zum Zeitpunkt 3 Monate lagen 709 Proteine unterschiedlich exprimiert vor, von denen 284 synaptisch assoziiert waren – hiervon konnten 182 dem postsynaptischen und 52 dem präsynaptischen Kompartiment zugeordnet werden (siehe Abb.42 B). Wie zum Zeitpunkt P28 lagen auch zum Zeitpunkt 3 Monate verschiedene GABA-, AMPA- und NMDA Proteine sowie auch die Neuroligine-2 und -3 und Neurexin-1 hochreguliert vor. Die GO-Anreicherungsanalyse der differentiell exprimierten Proteine zum Zeitpunkt 3 Monate zeigte, dass etwa 129 Proteine mit Neuronendifferenzierung, 114 Proteine mit der Entwicklung von Neuronenprojektionen und 57 Proteine mit Axonogenese in Verbindung gebracht werden konnten.

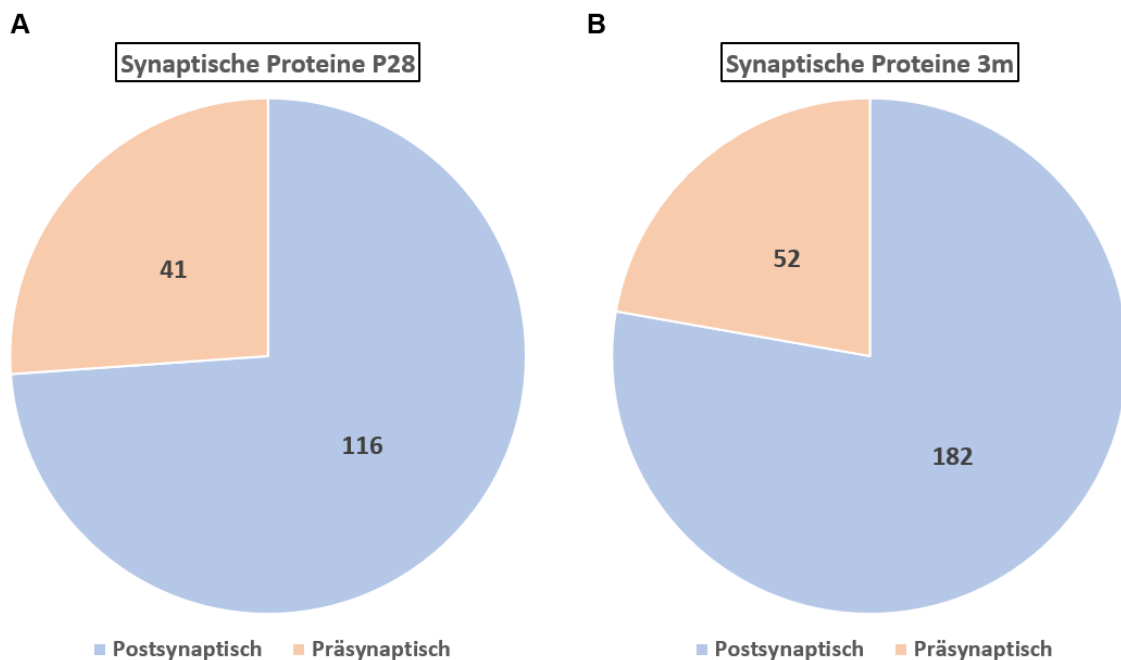


Abbildung 42: Kreisdiagramm zur Visualisierung differenziell exprimierter synaptischer Proteine zum Zeitpunkt P28 und 3m. Dabei veranschaulicht A) die Anzahl der differenziell exprimierten synaptischen Proteine zum Zeitpunkt P28 (157), von denen 116 dem postsynaptischen und 41 dem präsynaptischen Kompartiment zuzuordnen sind, und B) die Anzahl der differenziell exprimierten synaptischen Proteine zum Zeitpunkt von 3 Monaten (284), von denen 182 dem postsynaptischen und 52 dem präsynaptischen Kompartiment zuzuordnen sind.

Wie auch in Abbildung 42 gezeigt war festzustellen, dass zu beiden Zeitpunkten P28 und 3 Monate mehr postsynaptische als präsynaptische Proteine unter den differenziell exprimierten Proteinen identifiziert werden konnten, wonach die heterozygote *Tsc2*-Deletion das postsynaptische Kompartiment stärker zu beeinflussen scheint als das präsynaptische Kompartiment. Zusätzlich dazu wurde beobachtet, dass unter den differenziell exprimierten Proteinen des postsynaptischen Kompartiments zum Zeitpunkt P28 mehr Proteine hoch- als herunterreguliert waren, während zum Zeitpunkt 3 Monate verhältnismäßig mehr Proteine herunter- als hochreguliert vorlagen (siehe Abb.43 A). Bei den differenziell exprimierten Proteinen des präsynaptischen Kompartiments zeigte sich das genau gegenteilige Bild – hier lagen zum Zeitpunkt P28 mehr Proteine herunter- als hochreguliert vor, während zum Zeitpunkt 3 Monate mehr Proteine hoch- anstatt herunterreguliert zu sein schienen (siehe Abb.43 B). Dies deutet darauf hin, dass die Expression synaptischer Proteine zu den beiden Zeitpunkten gegenläufig reguliert zu sein scheint, was dynamische homöostatische Prozesse vermuten lässt.

Insgesamt konnte eine Überlappung von 57 differenziell exprimierten Proteinen zwischen P28 und 3 Monaten festgestellt werden, davon 16 Proteine, die mit synaptischen Prozessen assoziiert sind. Eine Übersicht dieser Proteine ist dem Netzwerk in Abb. 43 C

zu entnehmen. Unter den überlappenden differentiell exprimierten synaptischen Proteinen befanden sich unter anderem Neuroligin-2, Neuroligin-3, Neurexin-1, Cacng2, Arhgap32, Dlg4 und Shank2 – diese Proteine konnten bereits mit Autismus-Spektrum Störungen in Verbindung gebracht werden und waren daher von besonderem Interesse (Baig et al., 2017; Feyder et al., 2010; Schmeisser et al., 2012; Trotman et al., 2014; T. Wang et al., 2016).

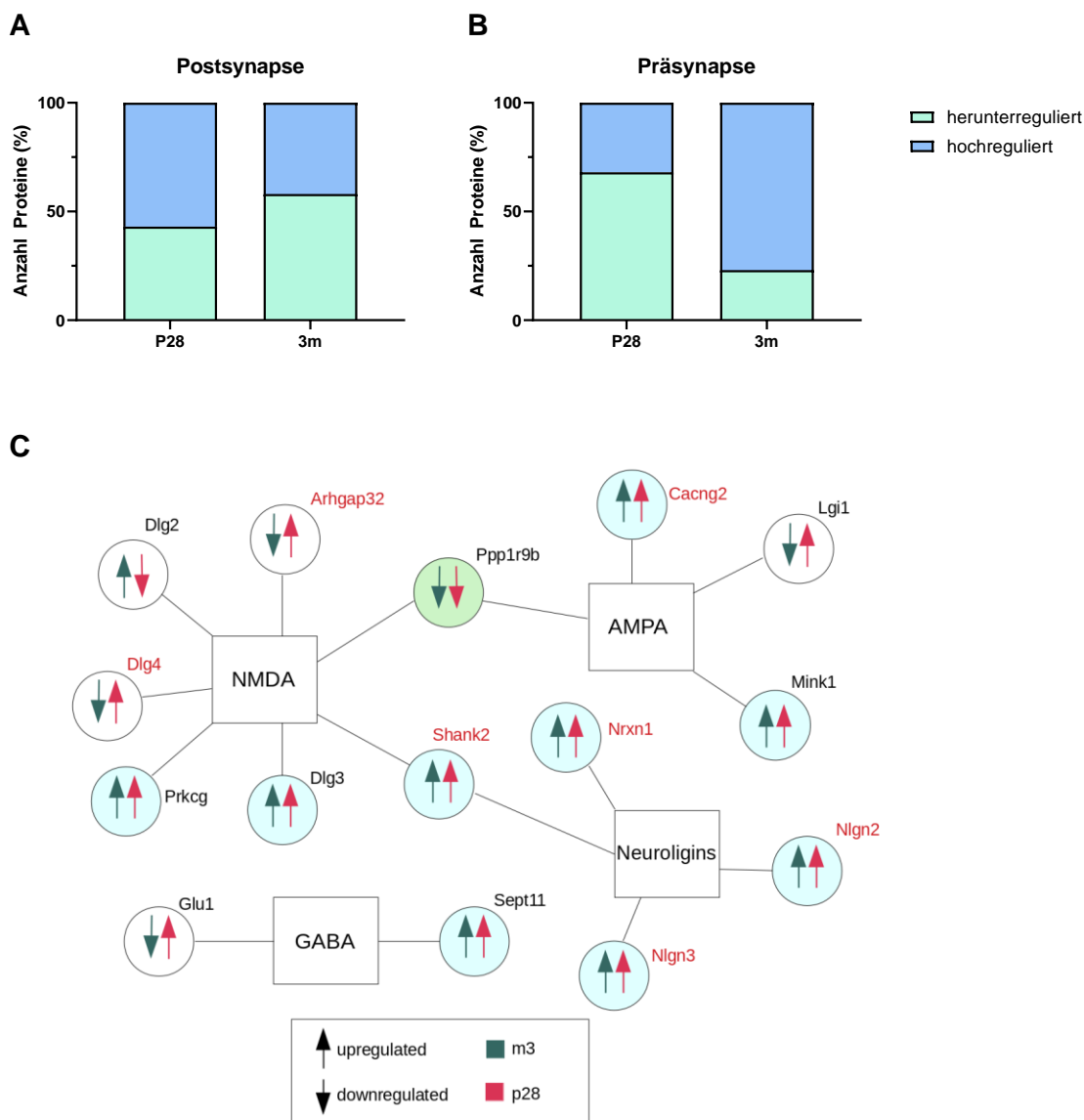



Abbildung 43: Proteomanalyse kortikaler Synaptosomen zu den Zeitpunkten P28 und 3 Monate. Überlappung von synaptischen Proteinen, welche mittels Massenspektrometrie in kortikalen Synaptosomen sowohl zum Zeitpunkt P28 als auch zum Zeitpunkt von 3 Monaten differentiell exprimiert vorliegen. Graph (A) veranschaulicht das postsynaptische Proteinverhältnis zum Zeitpunkt P28 und 3 Monate. Während in P28 etwa 58 % der postsynaptischen Proteine hochreguliert und 42 % herunterreguliert vorlagen, waren zum Zeitpunkt von 3 Monaten etwa 41 % der postsynaptischen Proteine hoch- und 59 % herunterreguliert. Graph (B) zeigt vergleichend das präsynaptische Proteinverhältnis zum Zeitpunkt P28 und 3 Monate. Während in p28 etwa 32 % der postsynaptischen Proteine hochreguliert und 68 % herunterreguliert vorlagen, waren zum Zeitpunkt von 3 Monaten etwa 77 % der postsynaptischen Proteine hoch- und 23 % herunterreguliert. Das Netzwerk (C) zeigt die überlappenden differentiell exprimierten Proteine zwischen

Zeitpunkt P28 und 3m, welche mit synaptischer Signalübertragung assoziiert sind. Proteine, die zu beiden Zeitpunkten herunterreguliert gefunden wurden, sind grün markiert, hochregulierte Proteine sind blau markiert. Rote Pfeile markieren Hoch- oder Herunterregulierung zum Zeitpunkt P28, blaue Pfeile markieren Hoch- oder Herunterregulierung zum Zeitpunkt 3 Monate. Rot geschriebene Proteine gelten als Autismus-assoziierte Proteine (Netzwerk erstellt durch ).

3.2.5 Dysregulation des Neuroligin/Neurexin-Systems in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen im Zeitverlauf

Neben Mutationen in den *Shank*-Genen gehören Mutationen in den Neuroligin- sowie Neurexin-Genen zu den häufigsten genetischen Ursachen für Autismus-Störungen (Baig et al., 2017). Neuroligine und Neurexine sind Zelladhäsionsmoleküle, die den synaptischen Spalt überspannen und die Kommunikation zwischen dem prä- und dem postsynaptischen Kompartiment regulieren. Die massenspektrometrische Proteomanalyse zeigte, dass unter anderem die Autismus-assoziierten Proteine Neuroligin-2, Neuroligin-3 und Neurexin-1 sowohl zum Zeitpunkt P28 als auch 3 Monate – also innerhalb der Zeitspanne, in der sich die Autismus-ähnlichen Auffälligkeiten in den heterozygoten *Tsc2*-Mäusen manifestierten – signifikant überexprimiert vorlagen.

Diese Ergebnisse sollten mittels Western-Blot-Analyse zu den Zeitpunkten P28 und 3 Monate in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen validiert werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl zum Zeitpunkt P28 als auch 3m die Expression von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 durchgängig erhöht vorlag. Während zum Zeitpunkt P28 im Homogenat die Expression von Neuroligin-2 in den heterozygoten Fraktionen im Vergleich zu wildtypischen Fraktionen signifikant überexprimiert vorlag, war für Neuroligin-3 und Neurexin-1 ein nicht-signifikanter Trend zu verzeichnen (Abb. 44 A). In den Synaptosomen war die Expression von Neuroligin-3 signifikant erhöht, für Neurexin-1 und Neuroligin-2 war ein Trend erkennbar (Abb. 44 B). Zum Zeitpunkt 3m konnte im Homogenat eine signifikante Überexpression für Neuroligin-2 und -3 festgestellt werden, Neurexin-1 zeigt hier einen nicht-signifikanten Trend (Abb.44 C). In der synaptosomalen Fraktion konnte hingegen keine signifikante Überexpression festgestellt werden, aber für Neuroligin-2 und Neurexin-1 ist ein Trend erkennbar (Abb.44 D).

Diese Daten weisen auf eine Dysregulation des Neuroligin/Neurexin-Systems in kortikalen Fraktionen innerhalb des kritischen Fensters der Phänotypentwicklung bei *Tsc2*^{+/-}-Tieren hin und bestätigt damit die Ergebnisse der Massenspektrometrie.

Um zu untersuchen, ob die Neuroligin/Neurexin-Dysregulation ein kortexspezifisches Phänomen ist, wurde die Expression von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 ebenfalls in hippocampalen Homogenaten und Synaptosomen zum Zeitpunkt P28 getestet. Anders als in den kortikalen Fraktionen war die Neuroligin/Neurexin-Expression in *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 45 A und B).

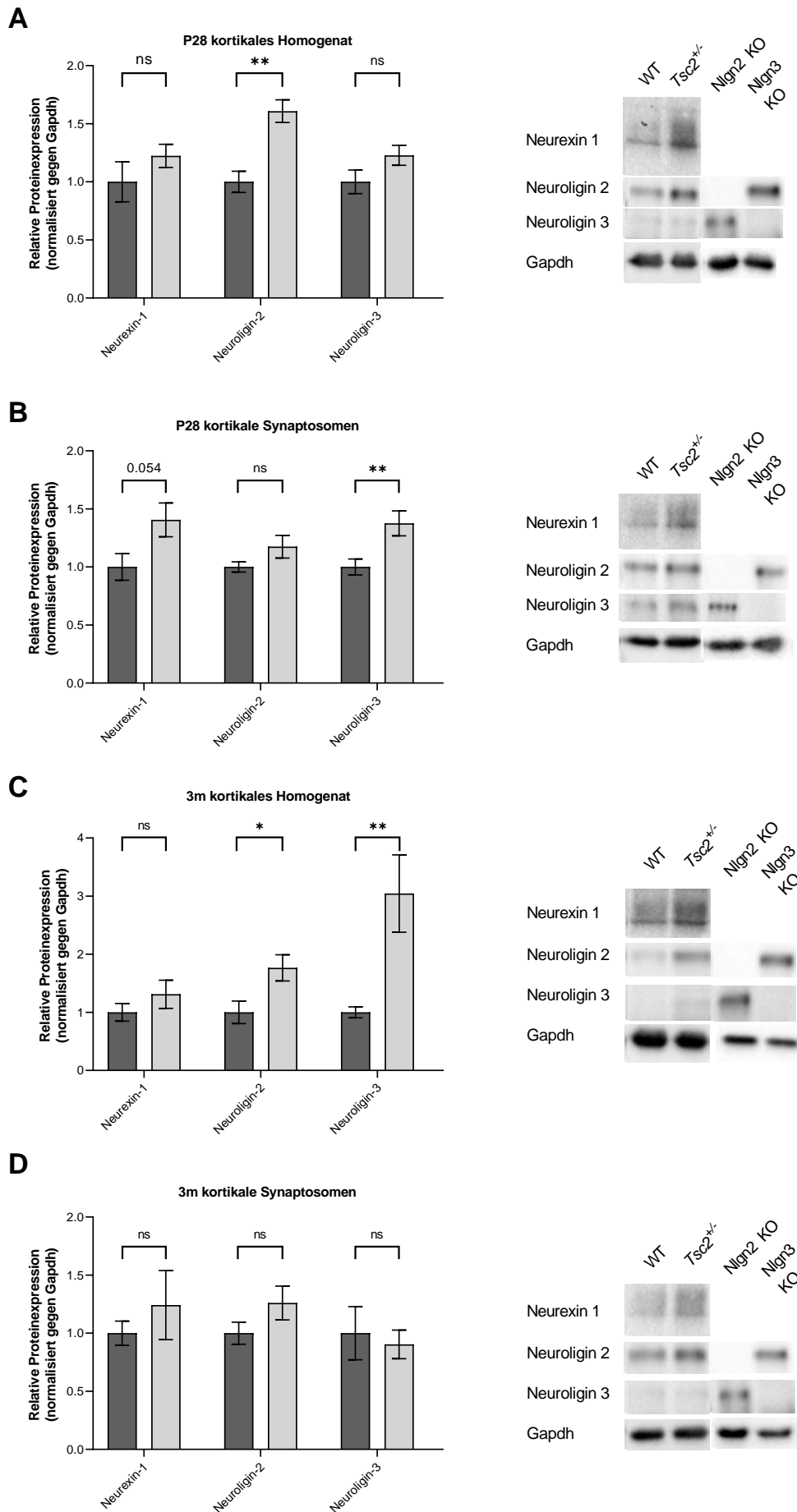


Abbildung 44: Relative Proteinexpressionsniveaus von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 zum Zeitpunkt P28 und 3m in kortikalen Fraktionen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der Proteinexpression in kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu den Zeitpunkten P28 und 3m. Während im Homogenat P28 die Expression von Neuroligin-2 in den heterozygoten Fraktionen im Vergleich zu wildtypischen Fraktionen signifikant überexprimiert vorlag ($P=0.0011$), war für Neuroligin-3 und Neurexin-1 ein nicht-signifikanter Trend zu verzeichnen (A). In den Synaptosomen war die Expression von Neuroligin-3 signifikant erhöht ($P=0.0145$), wohingegen Neurexin-1 knapp über Signifikanzniveau lag ($P=0.0537$); für Neuroligin-2 war ein Trend erkennbar (B). Zum Zeitpunkt 3m konnte im Homogenat eine signifikante Überexpression für Neuroligin-2 ($P=0.0356$) und -3 ($P=0.0108$) festgestellt werden, Neurexin-1 zeigt einen nicht-signifikanten Trend (C). In der synaptosomalen Fraktion konnte hingegen keine signifikante Überexpression festgestellt werden, aber für Neuroligin-2 und Neurexin-1 ist ein Trend erkennbar (D). Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

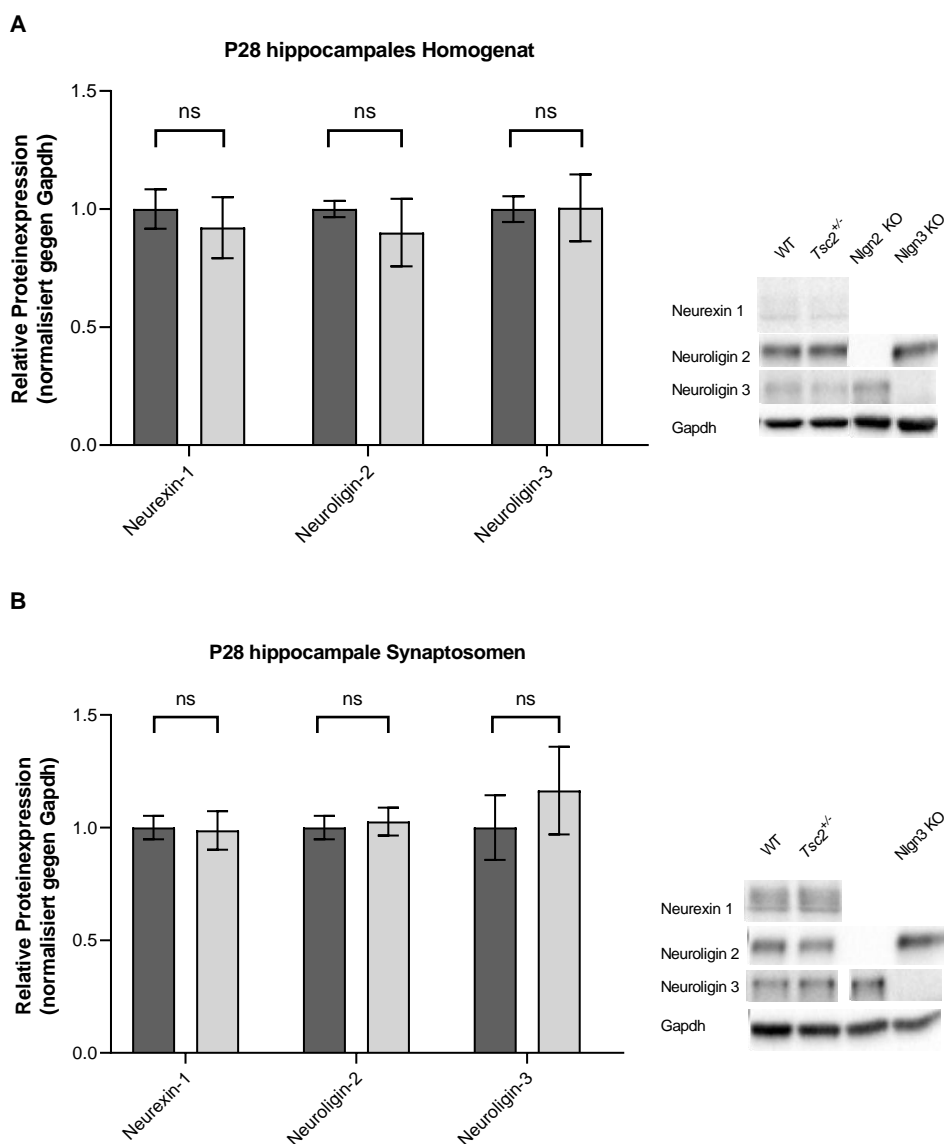


Abbildung 45: Relative Proteinexpressionsniveaus von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 zum Zeitpunkt P28 in hippocampalen Fraktionen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Neuroligin-2 und -3 sowie Neurexin-1 in hippocampalen Homogenaten und Synaptosomen zum Zeitpunkt P28. Sowohl die Neuroligin- als auch die Neurexin-Expression zeigte sich

in *Tsc2^{+/-}*- Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

3.3 Entstehung der kognitiven Defizite in alternden *Tsc2^{+/-}* Mäusen und Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen

In diesem Kapitel wird sich ausschließlich auf die Entstehung der kognitiven Defizite und der Untersuchung ihrer zugrunde liegenden molekularen Mechanismen fokussiert. Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, treten subtile kognitive Defizite erst spät, im Alter von 8-10 Monaten, auf. Daher wurden für die in diesem Kapitel beschriebenen Analysen ausschließlich Tiere im Alter von 8-10 Monaten verwendet.

3.3.1 Neuroanatomisches Tracing zur Untersuchung möglicher Projektionsdefizite in alternden *Tsc2^{+/-}* Mäusen

Während das Erlernen neuer Gedächtnisinhalte in 8-10 Monate alten *Tsc2^{+/-}*-Mäusen unverändert zu sein schien, zeigten unsere Verhaltensstudien in alten Mäusen, dass vor allem die Gedächtniskonsolidierung sowie auch das episodische Gedächtnis gestört sind. In einem Test zur Wiedererkennung neuer Objekte mit einer verlängerten Phase von 7 Tagen (zur Testung der Gedächtniskonsolidierung, nachfolgend 7d NORT abgekürzt) zwischen Trainingsphase und Testphase konnte bei 8-12 Monate alten *Tsc2^{+/-}* Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren eine signifikante Leistungsminderung beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.1.3). 3-4 Monate alte *Tsc2^{+/-}* Mäuse zeigten hingegen keinen Defekt in der Gedächtniskonsolidierung.

3.3.1.1 Vorangegangene Studie zur Expression unmittelbar früher Gene in alternden *Tsc2^{+/-}* Mäusen

Um die Mechanismen hinter dem Abfall der kognitiven Fähigkeiten aufzuklären, wurde in einer vorangegangenen Studie, durchgeführt von , die Expression unmittelbar früher Gene (*immediate early genes*/IEGs) im Rahmen des phänotypisch auffälligen 7d NORT und nach Isolation verschiedener Hirnstrukturen untersucht (Daten sind der Dissertation von Annabelle Arlt zu entnehmen (Arlt, 2019)). Die Aktivität unmittelbar früher Gene im Gehirn ist ein Maß für neuronale Aktivität. Insbesondere die Expression von IEGs wie *c-fos* oder *zif268* wird in Untergruppen von Neuronen in bestimmten Hirnregionen, die mit Lernen und Gedächtnisbildung verbunden sind, schnell

und selektiv hochreguliert. Wie bereits in Kapitel 1.1.6 erläutert, könnte eine Dysregulation von mTOR Einfluss auf die Expression verschiedener IEGs haben.

In der vorangegangenen Studie wurden die IEGs *c-fos* und *zif268* im Hippocampus, Gyrus dentatus, präfrontalen Kortex sowie dem entorhinalen Kortex – den Hauptstrukturen der Gedächtniskonsolidierung und des episodischen Gedächtnisses – analysiert. Mittels quantitativer Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression der IEGs unmittelbar nach Exposition des neuen Objekts in der Testphase des 7 Tage NOR in den *Tsc2^{+/-}* Mutanten signifikant reduziert vorliegt, wohingegen nach der Trainingsphase und nach dem unauffälligen 24h NORT keine Unterschiede festzustellen waren. Im speziellen waren die Unterschiede in der *c-fos* Expression im Gyrus dentatus, Hippocampus und präfrontalen Kortex, und in der *zif268* Expression im Gyrus dentatus und dem Hippocampus zu sehen (Arlt, 2019).

3.3.1.2 Neuroanatomisches Tracing

Die Ergebnisse der IEG Expressionsstudie deuten unter anderem auf einen subtilen hippocampalen Defekt hin. Mit Bezug auf die Ergebnisse der vorangegangenen Längsschnittanalyse wurde vermutet, dass die altersabhängige Entwicklung der kognitiven Beeinträchtigung auf einen degenerativen Prozess in alternden *Tsc2^{+/-}* Mutanten zurückzuführen sein könnte, welcher einerseits zum Zelltod und reduzierten Zellzahlen und andererseits zur Degeneration von Projektionen innerhalb der Gedächtnisschaltung führen könnte. Insbesondere der Austausch zwischen Gyrus dentatus und entorhinalem Cortex innerhalb des sogenannten Tractus perforans – eine Nervenfaserbahn, die Efferenzen aus der Area entorhinalis in die äußere Schicht des Gyrus dentatus leitet – beeinflusst das räumliche, soziale und kontextuelle Gedächtnis (Basu & Siegelbaum, 2015; Eichenbaum, 2014). Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten die Projektionen zwischen dem Hippocampus und dem entorhinalen Cortex in Hinblick auf degenerative Prozesse mittels neuroanatomischem Tracing untersucht werden.

Dem neuronalen Tract-tracing liegt das Prinzip des aktiven axonalen Transports zugrunde. Nach Applikation neuronaler Tracer werden einzelne Neurone beziehungsweise neuronale Pfade sowie deren Verlauf markiert. Im Falle des in diesem Experiment verwendeten Tracers, Cholera toxin subunit B, erfolgt der Transport retrograd, also „rückwärts“ von der terminalen Synapse hin zum Soma des Neurons. Die anschließende Detektion erfolgte über den optischen Nachweis mittels Elektronenmikroskopie. Die Prozessierung der finalen Rohdaten mit Hilfe der Software MATLAB sowie die Generation der Abbildungen wurde von (Arbeitsgruppe , Institut für Physiologie, Mainz) durchgeführt.

3.3.1.2.1 Intakte Hippocampusanatomie

Anhand der im Rahmen des Tract-Tracing Experiments angefertigten konfokalen Schnitte wurde zuerst die Hippocampusanatomie auf mögliche neurodegenerative Anomalien untersucht, welche aufgrund erhöhten Zelltodes in einer abweichenden Zellzahl oder Flächengröße einzelner Hirnareale resultieren würden. Wie exemplarisch in Abbildung 46A gezeigt, wurden für jedes untersuchte Individuum ($Tsc2^{+/-}$ und wildtypische Geschwistertiere) anhand der konfokalen Aufnahmen manuell die Bereiche des Gyrus Dentatus (GD) und des Cornu Ammonis 3 (CA3) definiert, innerhalb dieser dann anhand der DAPI-Zellkernfärbung semiautomatisch Zellen gezählt und die Flächengröße der einzelnen Hirnbereiche berechnet wurde. Die Quantifizierung der Zellzählung sowie der Flächengröße sowohl für den Bereich des DG als auch des CA3 zeigt, dass für keinen der untersuchten Parameter und keine der beiden Regionen ein signifikanter Unterschied zwischen $Tsc2^{+/-}$ -Mutanten und wildtypischen Geschwistertieren zu erkennen war (Abb.46 B). Somit kann ein makroskopisch degenerativer Prozess im Hippocampus als zugrundeliegende Ursache für die kognitiven Defizite in alten $Tsc2$ -Mäusen ausgeschlossen werden.

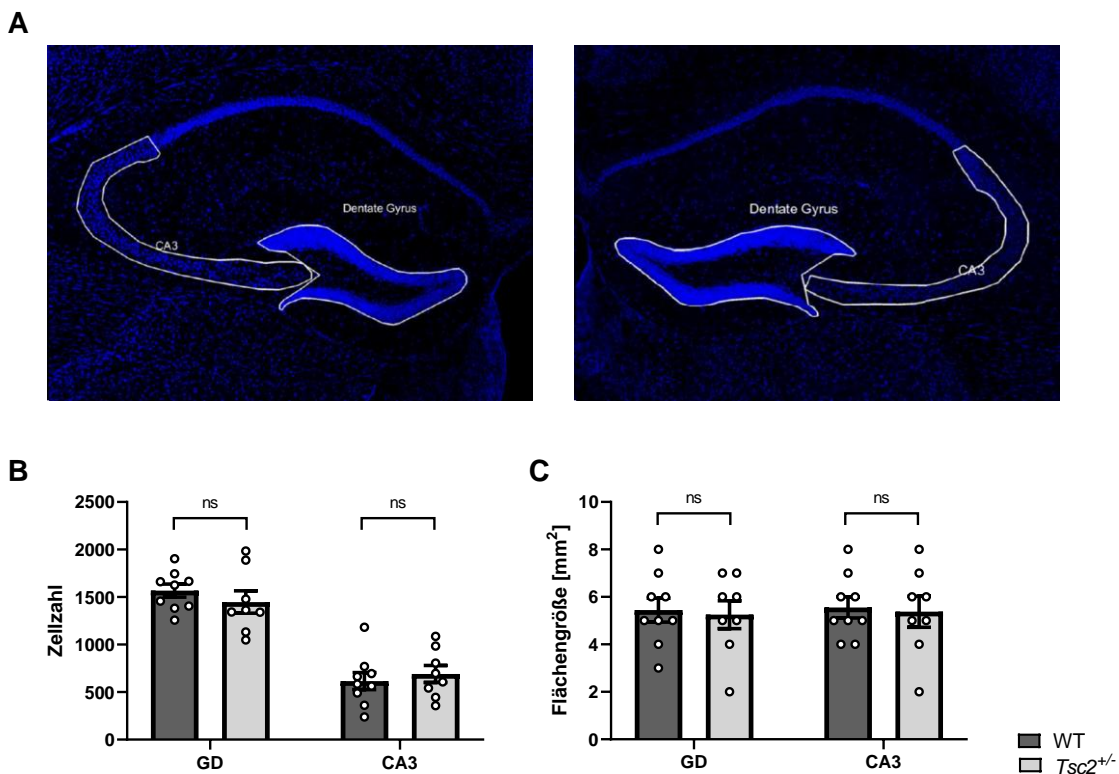


Abbildung 46: Analyse der Hippocampusanatomie. Abbildung (A) zeigt eine konfokale Aufnahme des dorsalen Hippocampus mittels Zellkernfärbung (DAPI-blau), in der die Regionen des Gyrus dentatus (GD) und des Cornu Ammonis 3 (CA3) exemplarisch definiert wurden; diese dienen zur Bestimmung der Zellzahl und Flächengröße in den definierten Bereichen. Graphen (B) und (C) zeigen die Quantifizierungen der Zellzählung (B) und der Flächengröße in mm^2 (C) für den GD und das CA3 in $Tsc2^{+/-}$ Mutanten und wildtypischen Geschwistern im Alter von 8-10 Monaten. Für keinen untersuchten Parameter und keine der beiden Regionen ist ein signifikanter Unterschied zwischen $Tsc2^{+/-}$ Mutanten und wildtypischen

Geschwistern zu erkennen. Quantifiziert wurde anhand des DAPI Signals. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

3.3.1.2.2 Intakte Projektionen innerhalb des Tractus perforans

In einem nächsten Schritt wurden die Degeneration neuronaler Projektionen innerhalb der Hauptstrukturen der Gedächtniskonsolidierung untersucht. Vorerst galt es, für jedes Individuum die Injektionsstellen elektronenmikroskopisch zu validieren (vgl. Abb. 47) und die Tiere mit fehlerhafter Injektion auszuschließen. Während die Injektionsstellen des dorsalen und ventralen Hippocampus für die meisten Individuen bestätigt werden konnten, kam es bei der Injektionsstelle des entorhinalen Cortex für die meisten Tiere zu Ausschlüssen aufgrund falscher Lokalisation oder Intensität, was durch die Tatsache, dass die Koordinate als tiefste Stelle im Maushirn schwer präzise erreichbar war, begründet werden konnte. Daher wurde die entorhinale Injektionsstelle im weiteren Verlauf der Analyse vollständig ausgeschlossen, da dies zu einer zu großen Variabilität in den Ergebnissen geführt hätte. Nach Validierung der Injektionsstellen und Ausschluss der Individuen mit fehlerhaften Injektionsstellen ergaben sich Gruppengrößen von $N(\text{WT}) = 9$ und $N(\text{Tsc2}^{+/-}) = 8$.

Von diesen wurde jeder zweite koronale Hirnschnitt des gesamten Maushirns eines jeden Tiers elektronenmikroskopisch in Hinblick auf mögliche Projektionen gescannt. Eine Übersicht der Hirnregionen, in denen projizierende Zellen detektiert werden konnten, ist der schematischen Abbildung 48 zu entnehmen.

Projizierende Zellen konnten vom dorsalen Hippocampus in den ipsilateralen entorhinalen Cortex, den ipsilateralen ventralen Hippocampus, den kontralateralen dorsalen sowie auch ventralen Hippocampus und in die supramammilaren Nuclei gefunden werden. Projektionen des ventralen Hippocampus konnten in dem ipsilateralen entorhinalen Cortex, dem ipsilateralen dorsalen Hippocampus, dem kontralateralen ventralen und dorsalen Hippocampus und den supramammilaren Nuclei gefunden werden. Diese Projektionen waren unter Abgleich der Literatur zu erwarten und befinden sich alle innerhalb des hippocampalen Schaltkreises. Die Projektionen der supramammilaren Nuclei wurde in den nachfolgenden Auswertungen nicht berücksichtigt, da diese Region für das Experiment nicht von Relevanz war.

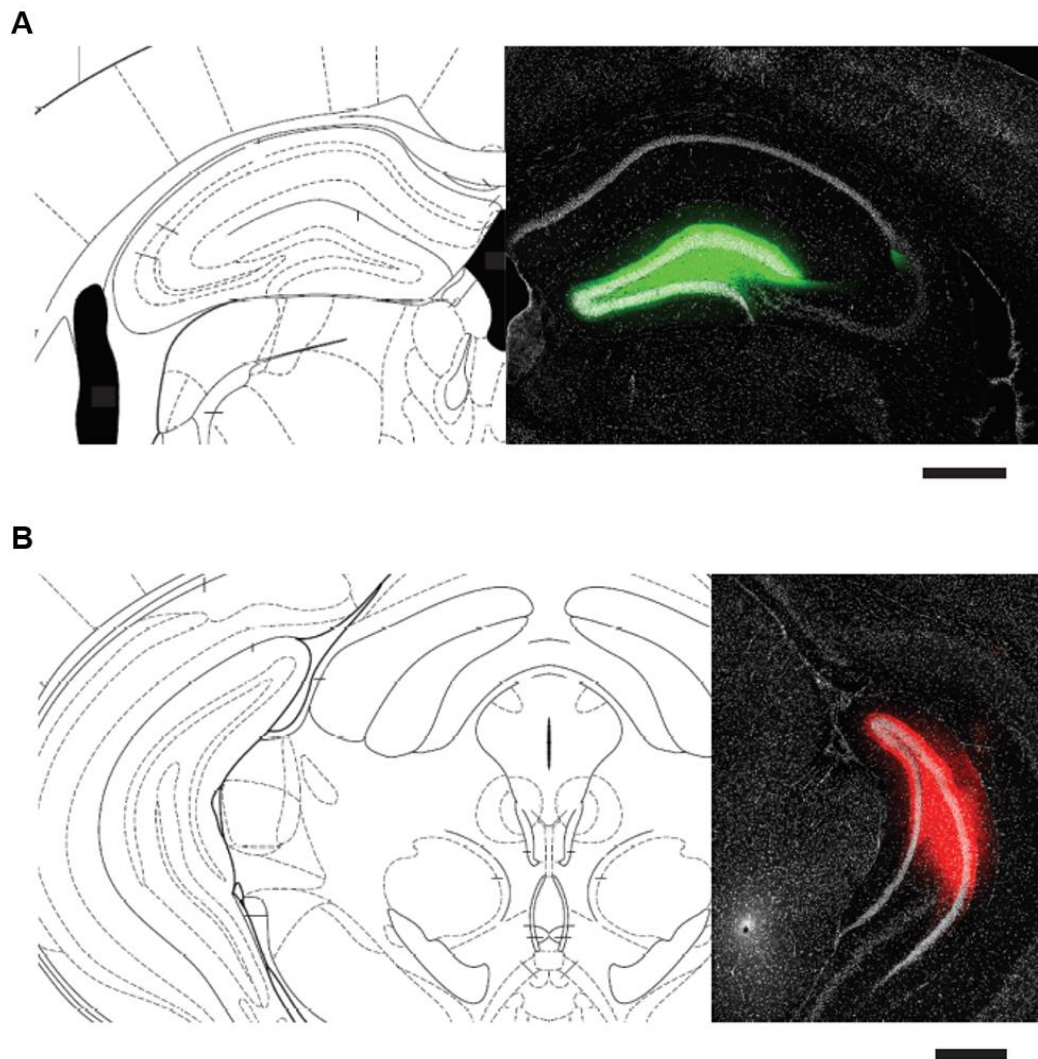


Abbildung 47: Elektronenmikroskopische Validierung der Injektionsstellen hinsichtlich Lokalität und Intensität. Mit Hilfe der koronalen Diagramme aus „The Maus brain in stereotaxic coordinates“ (Dr. George Paxinos und Dr. Keith Franklins) und den definierten Koordinaten wurden die Injektionsstellen ipsilateral für jedes Tier untersucht und bewertet. (A) und (B) zeigen exemplarische konfokale Aufnahmen des dorsalen Hippocampus (A) mit GFP-Signal und des ventralen Hippocampus (B) mit RFP Signal unter Abgleichung der koronalen Diagramme und Koordinaten. Individuen ohne valide Injektionsstellen wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Im nächsten Schritt wurden in den einzelnen Regionen, in denen Projektionen detektiert werden konnten, manuell Bereiche definiert, in denen semiautomatisch mit Hilfe der Software MATLAB Zellen in jedem der farbigen Kanäle identifiziert und markiert werden konnten (der blaue Kanal zählte anhand des DAPI Signals alle Zellen, die grünen und roten Kanäle zählten die einzelnen Projektionen aus dem dorsalen oder ventralen Hippocampus, vgl. Abb. 49 A). Die absolute Anzahl der Zellen konnte dann als Balkendiagramm wiedergegeben (siehe Abb.49 B) und zur weiteren Berechnung verwendet werden.

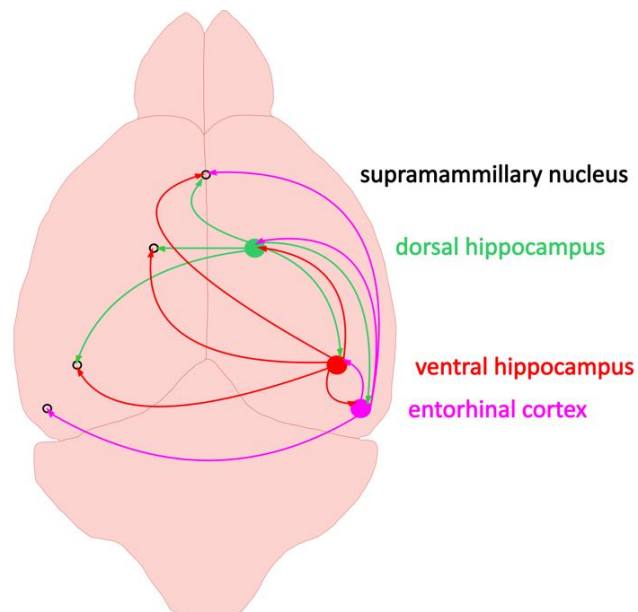


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Hirnregionen, in denen projizierende Neurone detektiert werden konnten. Projektionen konnten vom dorsalen Hippocampus (grüne Injektionsstelle) in den ipsilateralen entorhinalen Cortex, den ipsilateralen ventralen Hippocampus, den kontralateralen dorsalen sowie auch ventralen Hippocampus und in die supramammillaren Nuclei gefunden werden (visualisiert durch grüne Pfeile). Projektionen des ventralen Hippocampus (rote Injektionsstelle) konnten in dem ipsilateralen entorhinalen Cortex, dem ipsilateralen dorsalen Hippocampus, dem kontralateralen ventralen und dorsalen Hippocampus und den supramammillaren Nuclei gefunden werden (visualisiert durch rote Pfeile).

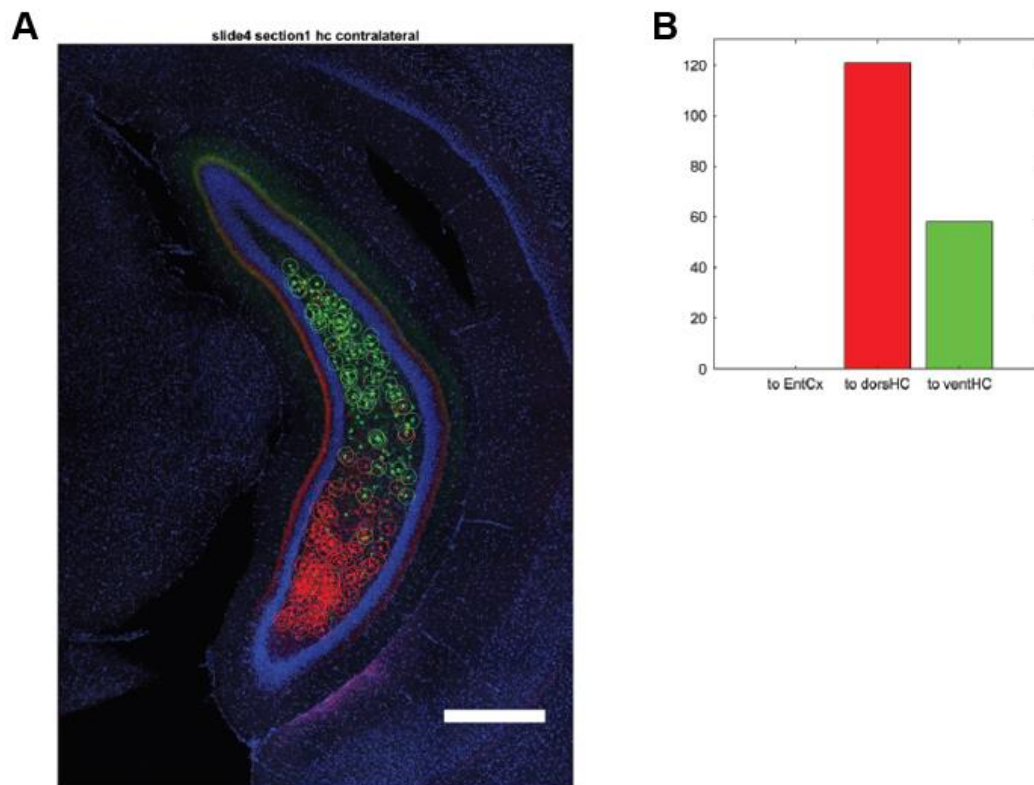


Abbildung 49: Identifikation positiver Projektionen am Beispiel des kontralateralen ventralen Hippocampus. (A) zeigt eine beispielhafte konfokale Aufnahme des kontralateralen ventralen

Hippocampus inklusive positiver Projektionen aus dem dorsalen (rot) und dem ventralen (grün) Hippocampus. Die Position der positiven Zellen ist mit einem Kreis in der entsprechenden Farbe markiert. (B) zeigt ein zugehöriges Balkendiagramm, welches die absolute Anzahl positiver Zellen in dieser Aufnahme pro Kanal visualisiert.

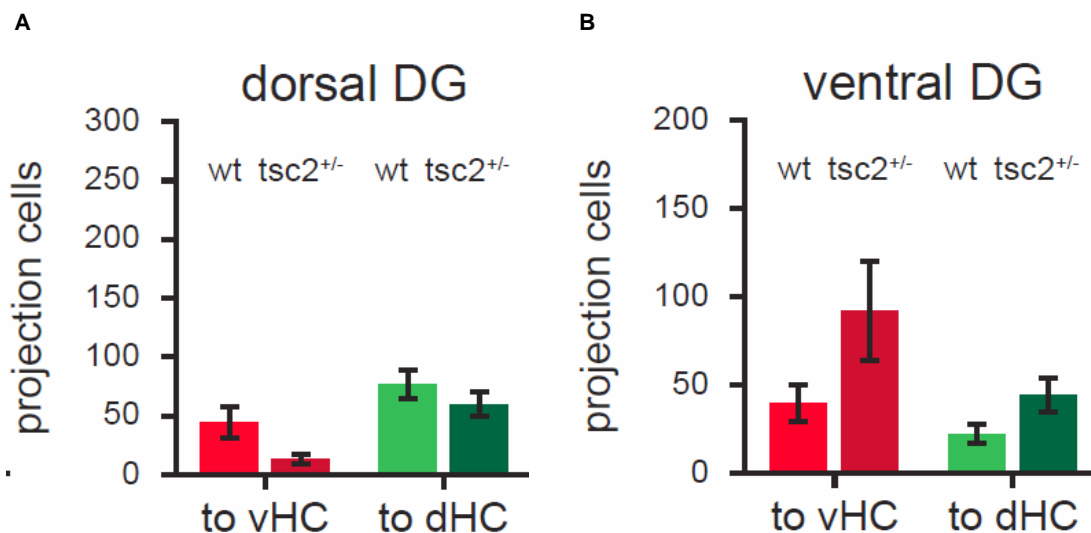


Abbildung 50: Anzahl der projizierenden Zellen in der jeweiligen Hirnregion. Dargestellt ist die mittlere Anzahl projizierender Zellen vom dorsalen Gyrus Dentatus (A) in den kontralateralen ventralen (rot) und dorsalen (grün) Hippocampus in wildtypischen und heterozygoten *Tsc2*-Mäusen, sowie vom ventralen Gyrus Dentatus (B) in den kontralateralen ventralen (rot) und dorsalen (grün) Hippocampus. Zwischen wildtypischen und heterozygoten *Tsc2*-Mäusen war in keiner der untersuchten Hirnregionen signifikanter Unterschied in der Anzahl der projizierenden Zellen zu sehen.

Nach Berechnung der mittleren Anzahl projizierender Zellen vom dorsalen Gyrus Dentatus in den kontralateralen ventralen und dorsalen Hippocampus sowie dem ventralen Gyrus Dentatus in den kontralateralen ventralen und dorsalen Hippocampus konnte für keine der untersuchten Hirnregionen ein signifikanter Unterschied zwischen *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und wildtypischen Geschwistern festgestellt werden (siehe Abb. 50). Dies lässt auf intakte Projektionen innerhalb des hippocampalen Schaltkreises schließen und unterstützt die Hypothese, dass den kognitiven Defiziten in alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen kein die Projektionen betreffender degenerativer Prozess zugrunde liegt.

3.3.2 Proteom-Analyse in alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen

Da sowohl die kognitiven Defizite in alternden *Tsc2*^{+/-}-Tieren als auch die IEG-Analyse auf einen Defekt des Hippocampus hindeuten, jedoch neurodegenerative Prozesse anhand intakter Zellzahlen und Projektionen ausgeschlossen werden können, wurde ein eher subtiler Defekt als zugrunde liegende Ursache vermutet.

Um zu untersuchen, ob das Proteom hippocampaler Neurone von *Tsc2*^{+/-}-Tieren gegenüber wildtypischen Kontrollen verändert vorliegt, wurden Hippocampi 8-10

Monate alter Tiere (*Tsc2*^{+/-} und Wildtyp) isoliert, in Homogenate sowie Synaptosomen fraktioniert und hinsichtlich differentiell exprimierter Proteine massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektrometrie wurde von der Core Facility for Mass Spectrometry & Proteomics of the Research Center for Immunotherapy (FZI) in Mainz unter Leitung von [Name] durchgeführt und ausgewertet. Während im Proteom heterozygoter Homogenate im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren nur sehr wenige Veränderungen zu beobachten waren, wurde in den synaptosomalen Fraktionen eine erhebliche Herunterregulation synaptischer Membranproteine rund um den NMDA-Rezeptor GluN2A und verschiedener Proteine, die mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind – einschließlich β -Aktin selbst – festgestellt (Abb. 51).

Da bereits mehrere Studien, unter anderem eine Publikation von Huang et al. (W. Huang et al., 2013), einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Aktin-Polymerisation und Defekten in der Gedächtniskonsolidierung, vermittelt durch mTORC2, nachweisen konnten, war dieser Befund von besonderem Interesse. Kurz erläutert, kann Aktin als Strukturprotein und Bestandteil des Zytoskeletts sowohl als globuläres Einzelmolekül (G-Aktin) als auch als Mikrofilament (F-Aktin) vorliegen. Der Polymerisationsvorgang von G- zu F-Aktin verläuft dynamisch, ebenso umgekehrt auch der Abbau des Filaments zum globulären Aktin, wodurch sich das Aktin-Netzwerk einer Zelle rasch Veränderungen anpassen und dadurch zur Zellbewegung beitragen kann, was im Gehirn vor allem bei der Formation von Dendriten und Synapsen essenziell ist.

Um den Befund der massenspektrometrischen Analyse zu validieren, wurden wiederum Hippocampi 8-10 Monate alter Tiere (*Tsc2*^{+/-} und Wildtyp) isoliert, in Homogenate sowie Synaptosomen fraktioniert und mittels Western Blot unter anderem hinsichtlich der mTOR-Zielgene phospho-S6 und phospho-Akt, β -Aktin sowie auch GluN2A analysiert.

Überraschenderweise zeigten sich in keiner der beiden Fraktionen Unterschiede in der Proteinexpression von Tsc2, noch waren Abweichungen in der mTOR-Signalübertragung sichtbar (wie bereits in 3.2.1 und 3.2.2 erläutert; siehe Abb.52), was wiederum darauf hindeutet, dass der ursprüngliche Defekt bei heterozygoten *Tsc2*^{+/-}-Tieren in alternden Tieren kompensiert zu sein scheint und sich die hier beobachteten kognitiven Defekte unabhängig von dem primären Gendefekt entwickelt haben. Zusätzlich dazu konnte weder ein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von β -Aktin selbst noch von GluN2A detektiert werden (Abb.52).

Um zu untersuchen, ob anstelle einer Fehlexpression von β -Aktin selbst die Polymerisation von Aktin betroffen sein könnte, wurde Aktin biochemisch in seine beiden Zustandsformen F- und G-Aktin fraktioniert. Da die Vermutung bestand, dass die traditionelle semi-quantitative Western Blot Methode nicht sensitiv genug sein könnte, um Aktin-Polymerisationsdefekte zu identifizieren, wurde eine sensitivere,

automatisierte und kapillarbasierte Western-Blot Methode („Simple Western“ by proteinsimple/Biotechne®) angewandt (siehe Abb. 53).

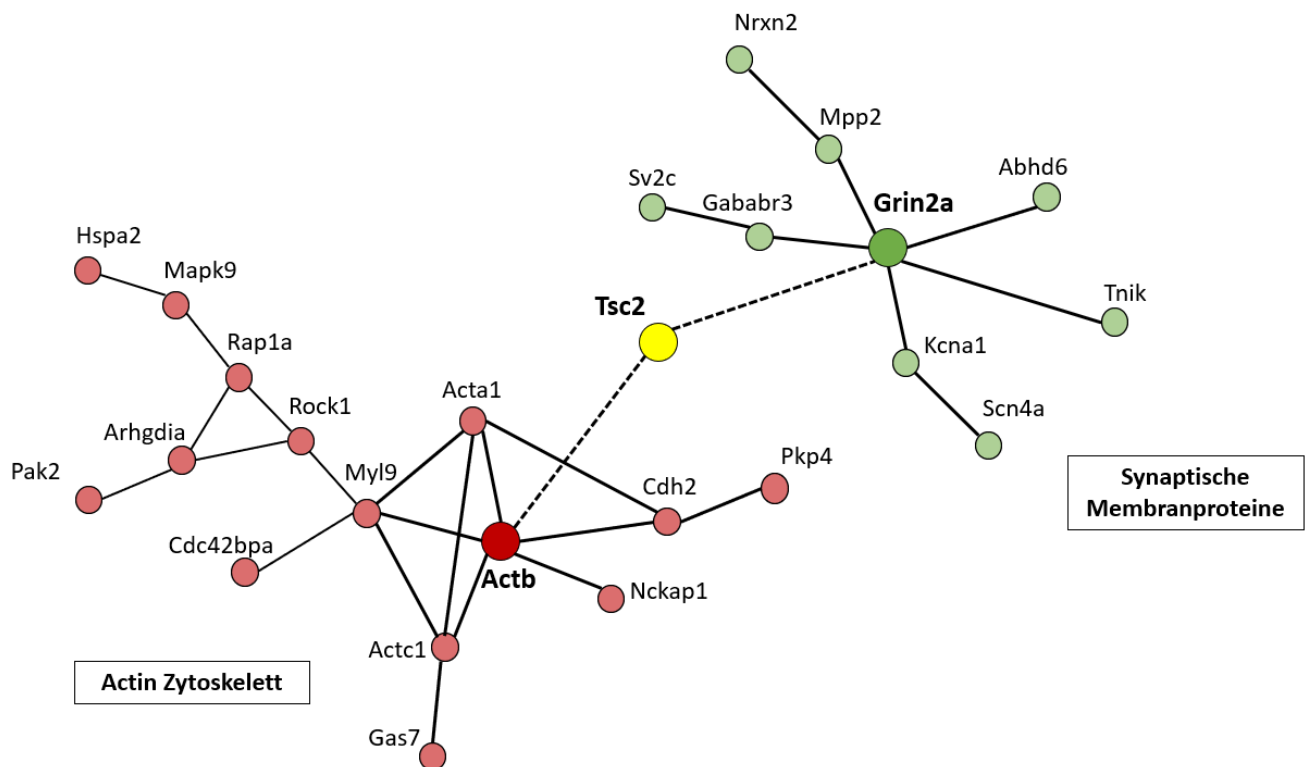


Abbildung 51: Teilnetz des Tsc2-Interaktoms, welches die Herunterregulierung von synaptischen Membran- und Zytoskelett-assoziierten Proteinen darstellt. Die Netzwerkanalyse wurde unter Verwendung von STRING (Version 11.0, <http://string-db.org>) durchgeführt. Mehrere Proteine, von denen bekannt ist, dass sie mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind, (hauptsächlich β -Aktin (Actb)), sowie synaptische Membranproteine wie die NMDA-Rezeptoruntereinheit GluN2A (Grin2a) wurden im proteomischen Datensatz von 8-10 Monate alten hippocampalen Synaptosomen von $Tsc2^{+/-}$ Mutanten und wildtypischen Geschwistertieren als signifikant differentiell identifiziert.

Anhand dieser kapillarbasierten Western-Blot Methode konnte nach Analyse der Proteinexpression von β -Aktin in der jeweiligen globulären und filamentösen Fraktion kein Unterschied im Verhältnis von F-Aktin zu G-Aktin nachgewiesen werden (siehe Abb. 54). Dies konnte zusätzlich *in vivo* bestätigt werden. Analog zur Studie von Huang et al. wurde zusätzlich eine Kohorte alternder $Tsc2^{+/-}$ -Tiere sowie deren wildtypischer Geschwistertiere innerhalb des 7d NORT mit Jasplakinolide (JPK) injiziert – ein Wirkstoff, der nachweislich die Aktin-Polymerisation fördern und dadurch die Gedächtniskonsolidierung verbessern kann (W. Huang et al., 2013). Die Injektion erfolgte bilateral in den dorsalen Hippocampus von $Tsc2^{+/-}$ -Tieren und wildtypischen Geschwistern unmittelbar nach dem zweiten Training des 7d NORT injiziert (siehe Schema in Abb. 55 A). 7 Tage nach Injektion wurden die Tiere in der Testphase des 7d

NORT mit einem neuen Objekt getestet und die Explorationszeiten gemessen. Die Diskriminierungsindizes der *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigten nach Jasplakinolid-Injektion gegenüber der Vehikelkontrolle keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 55 B). Somit konnte ein Defekt in der Aktin-Polymerisierung als zugrunde liegende Ursache für die Konsolidierungsstörung alternder *Tsc2*^{+/-}-Tiere ausgeschlossen werden.

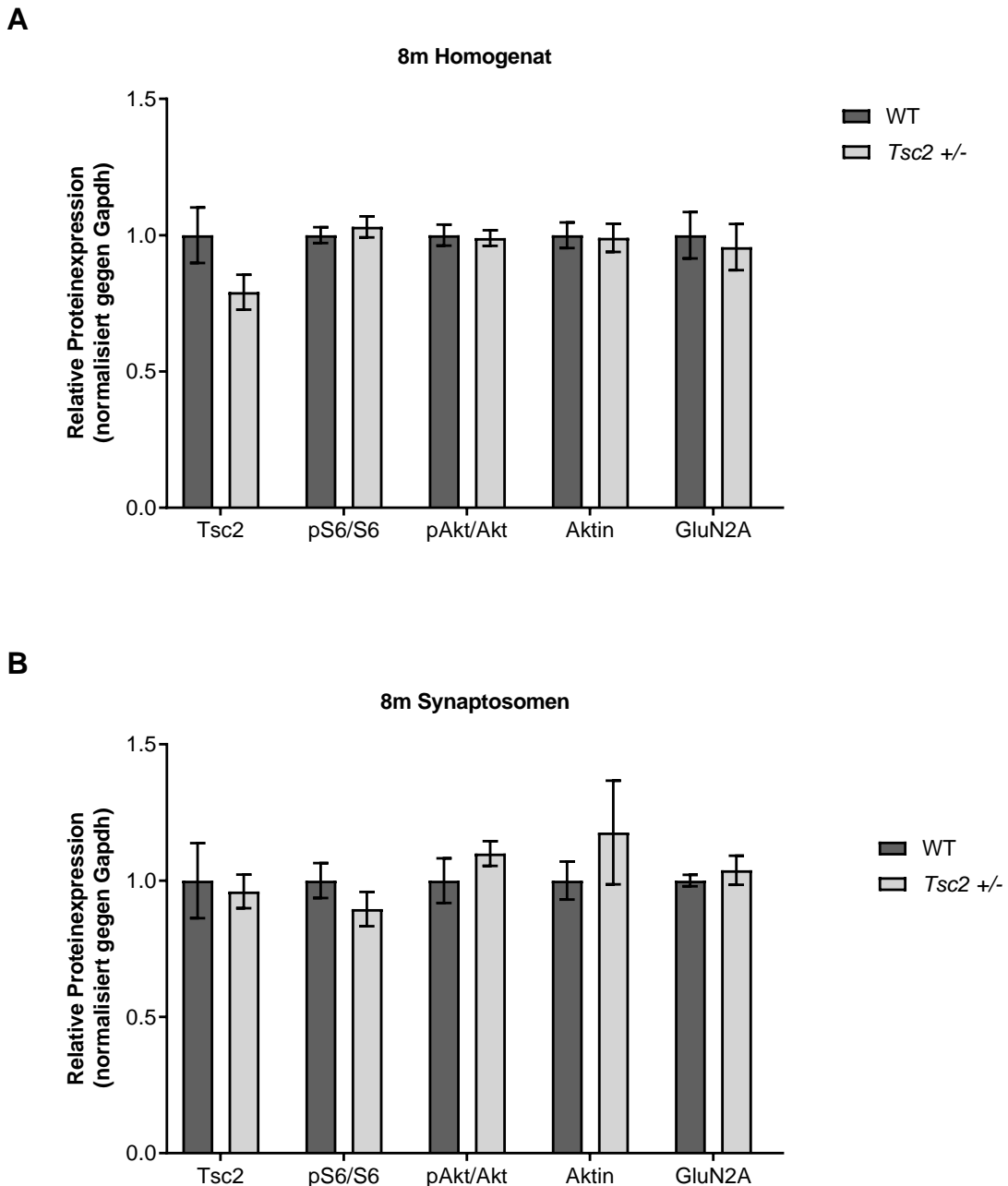


Abbildung 52: Relative Proteinexpressionsniveaus ausgewählter Proteine zum Zeitpunkt von 8 Monaten in hippocampalen Fraktionen. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von Tsc2, pS6/S6, pAkt/Akt, β -Aktin sowie GluN2A in hippocampalen Homogenaten und Synaptosomen zum Zeitpunkt 8m. Die Expression aller analysierten Proteine zeigte sich in *Tsc2*^{+/-}- Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die Werte wurden gegen Gapdh normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM

dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab, Excel und GraphPad PRISM.

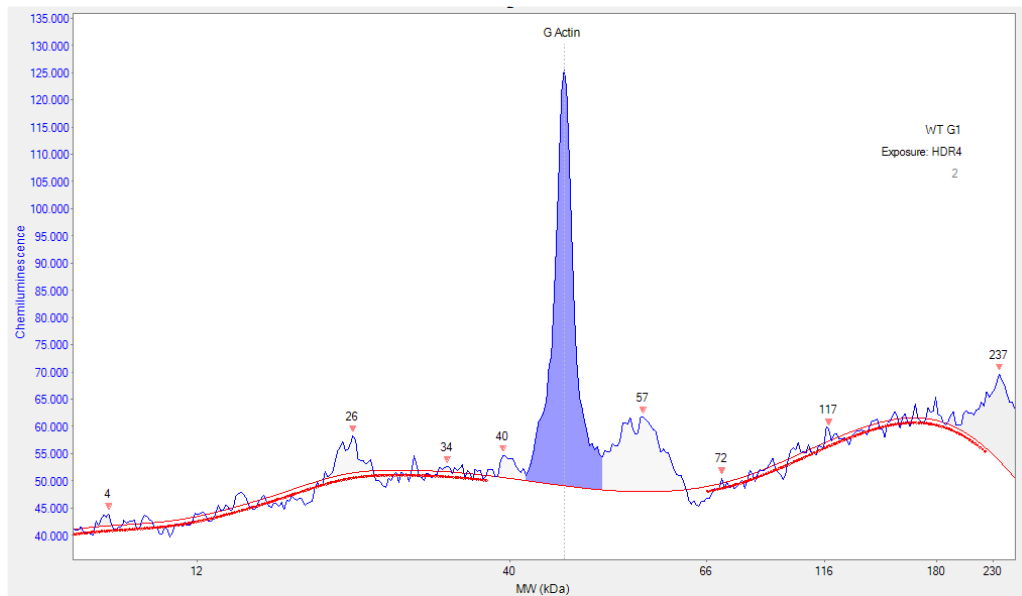
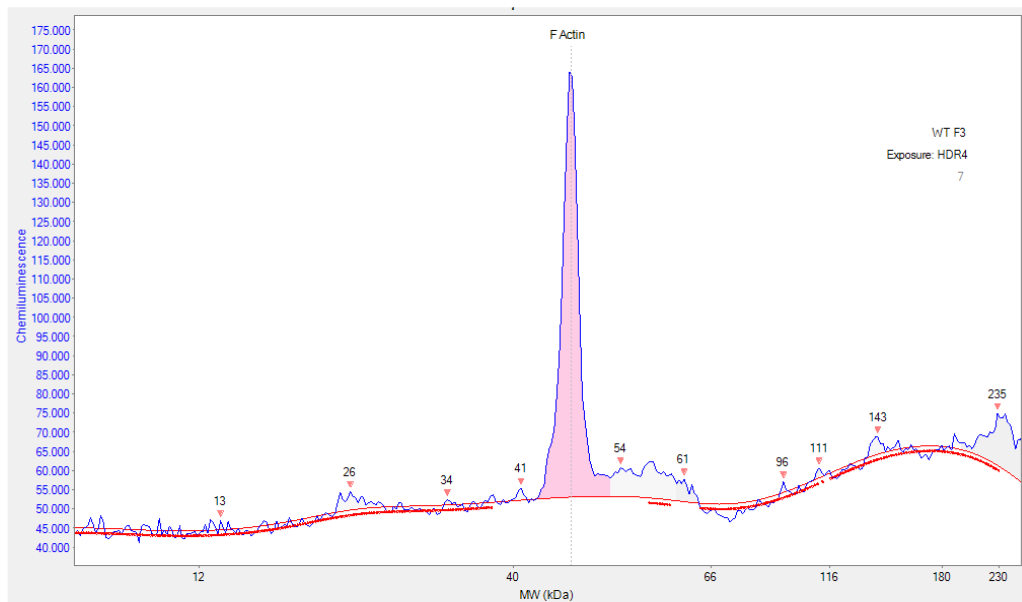
A**B**

Abbildung 53: Beispielhafte Darstellung der einzelnen Peaks für G- und F-Aktin nach kapillarbasierter Western-Blot Methode. Sowohl für G- als auch F-Aktin war in jeder der untersuchten Proben ein einzelner Peak mit einem ausreichend hohen Chemilumineszenzsignal zu detektieren. Der Bereich unter dem Peak (farbig markiert) wurde berechnet und dieser Wert zur Quantifizierung verwendet.

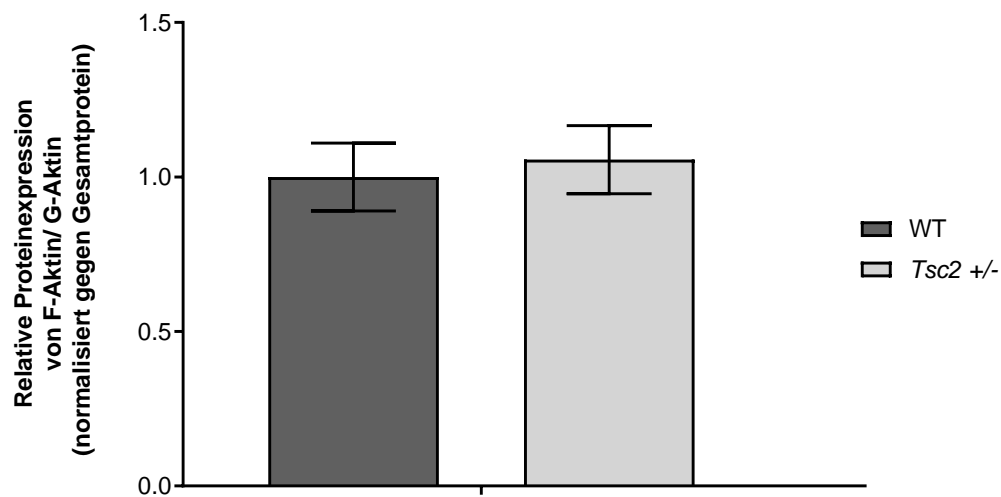


Abbildung 54: Relative Proteinexpression von F-Aktin zu G-Aktin zum Zeitpunkt von 8 Monaten im Hippocampus. Halbquantitative Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von β -Aktin in hippocampalen Fraktionen globulären und filamentösen Aktins zum Zeitpunkt von 8 Monaten. Die Proteinexpression der beiden β -Aktin-Fraktionen zueinander zeigte sich in *Tsc2*^{+/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die Werte wurden gegen das Gesamtprotein normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Compass for SW, Excel und GraphPad PRISM.

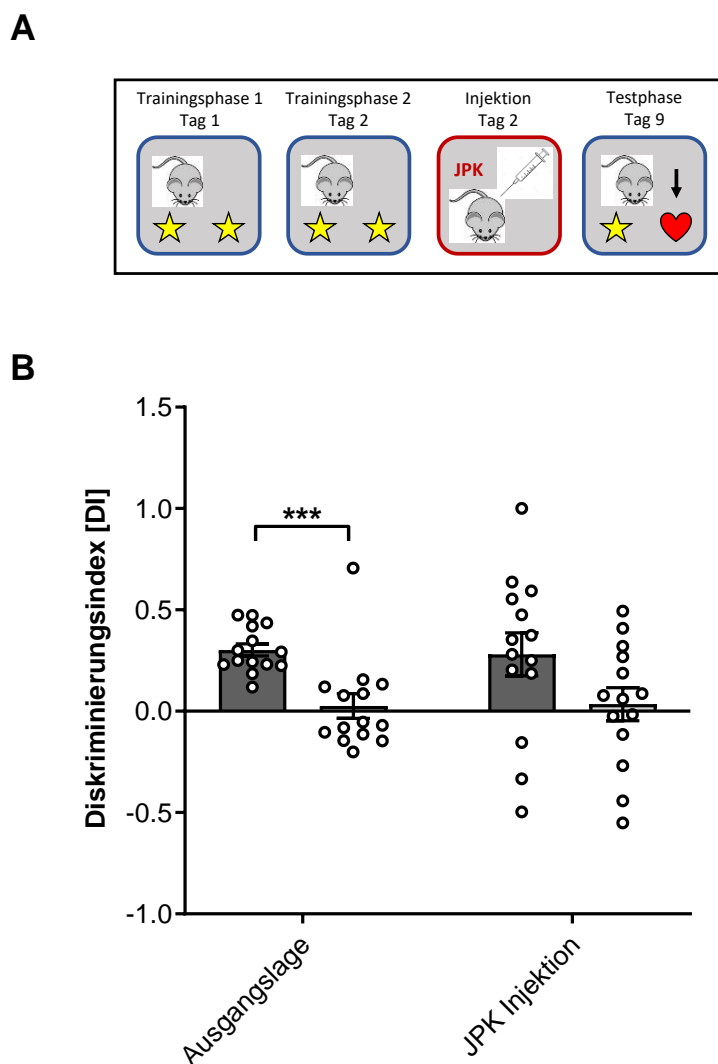


Abbildung 55: Keine Wiederherstellung der kognitiven Funktionen nach JPK-Injektion in 8-10 Monate alten $Tsc2^{+/-}$ Mäusen. Die Kohorte wurde zuerst in einem unabhängigen 7d NORT mit anderen Objektpaaren zum Nachweis des kognitiven Phänotyps getestet (Ausgangslage); hier zeigten die $Tsc2^{+/-}$ Mäuse wie erwartet eine signifikante Leistungsminderung im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern. In einem zweiten 7d NORT mit neuen Objektpaaren wurden den Mäusen unmittelbar nach der zweiten Trainingsphase an Tag 2 JPK (oder DMSO als Vehikelkontrolle) bilateral in den dorsalen Hippocampus injiziert. An Tag 9 des NORT, also 7 Tage nach Injektion, wurden den Tieren ein ihnen unbekanntes Objekt gezeigt und der Diskriminierungsindex bestimmt. $Tsc2^{+/-}$ Mäuse zeigten nach Vehikelinjektion weiterhin signifikant den Konsolidierungsdefekt, während nach JPK-Injektion zwar kein signifikanter Unterschied zu wildtypischen Geschwistern, aber ein deutlicher Trend erkennbar ist. Weiterhin ist kein signifikanter Unterschied zwischen Vehikel-injizierten und JPK injizierten $Tsc2^{+/-}$ Mäusen erkennbar. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm SEM.

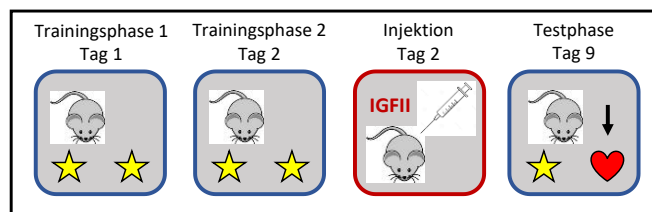
3.3.3 *In vivo* Behandlung zur Wiederherstellung der kognitiven Funktionen

3.3.3.1 Einfluss von IGF-II auf die Gedächtniskonsolidierung alternder $Tsc2^{+/-}$ -Tiere

Der Wachstumsfaktor IGF-II kann nach Injektion in den Hippocampus nachweislich die Gedächtniskonsolidierung in Mäusen verbessern (Bryzgalov et al., 2018; Pascual-Lucas et al., 2014b; Stern, Chen, et al., 2014). Um mögliche Auswirkungen von IGF-II auf die Gedächtniskonsolidierung im heterozygoten $Tsc2$ -Mausmodell zu untersuchen, wurde

rekombinantes IGF-II (oder PBS als Vehikelkontrolle) bilateral in den dorsalen Hippocampus von *Tsc2*^{+/-}-Tieren und wildtypischen Geschwistertieren unmittelbar nach dem zweiten Training des 7d NORT injiziert (siehe Schema in Abb. 56 A). 7 Tage nach Injektion wurden die Tiere in der Testphase des 7d NORT mit einem neuen Objekt getestet und die Explorationszeiten gemessen. Die Diskriminierungsindizes der *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigten nach IGFII-Injektion gegenüber der Vehikelkontrolle eine signifikante Erhöhung, wodurch sie dem Niveau der wildtypischen Geschwistertiere entsprachen (Abb. 56 B). Das bedeutet, dass die *Tsc2*^{+/-}-Tiere nach IGF-II-Injektion in der Lage waren, ein schon bekanntes Objekt von einem neuen zu unterscheiden, während sie im gleichen Test ohne Injektion (und mit anderen Objektpaaren) noch einen Konsolidierungsdefekt zeigten. Somit konnte der Gedächtnis-verbessernde Effekt von IGF-II in Mäusen auch in unserem Mausmodell bestätigt werden.

A



B

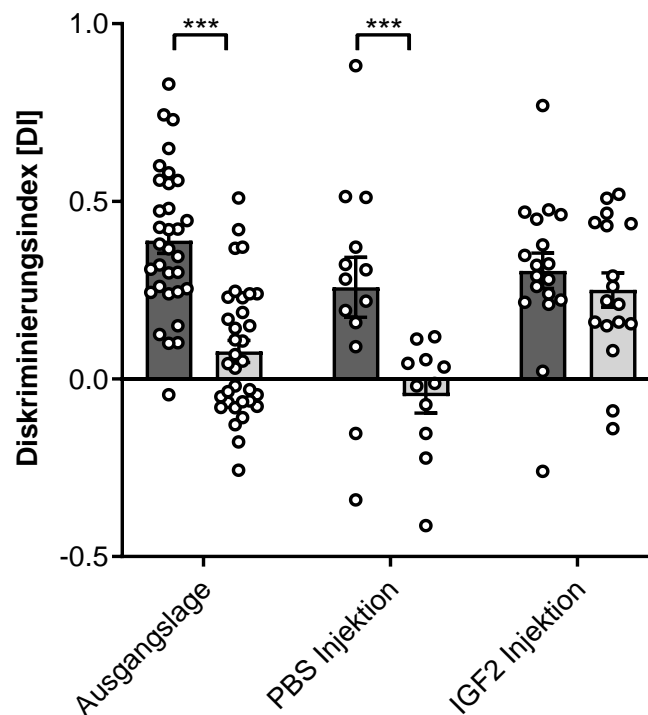


Abbildung 56: Wiederherstellung der kognitiven Funktionen nach IGF-II-Injektion in 8-10 Monate alten *Tsc2*^{+/-} Mäusen. Die Kohorte wurde zuerst in einem unabhängigen 7d NORT mit anderen Objektpaaren zum Nachweis des kognitiven Phänotyps getestet (Ausgangslage); hier zeigten die *Tsc2*^{+/-}-Mäuse wie erwartet eine signifikante Leistungsminderung im Vergleich zu wildtypischen

Geschwistertieren. In einem zweiten 7d NORT mit neuen Objektpaaren wurden den Mäusen unmittelbar nach der zweiten Trainingsphase an Tag 2 rekombinantes IGF-II (oder PBS als Vehikelkontrolle) bilateral in den dorsalen Hippocampus injiziert. An Tag 9 des NORT, also 7 Tage nach Injektion, wurden den Tieren ein ihnen unbekanntes Objekt gezeigt und der Diskriminierungsindex bestimmt. Während die *Tsc2*^{+/-} Mäuse nach Vehikelinjektion weiterhin den Konsolidierungsdefekt zeigten, ging der Diskriminierungsindex nach IGF-II-Injektion in den heterozygoten Tieren auf Wildtyp-Niveau zurück. Die Werte zeigen Mittelwerte ± SEM.

3.3.3.2 Einfluss von IGF-II auf die Expression der unmittelbar frühen Gens *c-fos* und *zif268* in alternden *Tsc2*^{+/-} Mäusen

In einer kürzlich durchgeführten Studie von Yu et al. konnte zusätzlich zur Verbesserung der Gedächtnisleistung ein Effekt von IGF-II über die Aktivierung des IGF-II-Rezeptors auf die Transkription von IEGs und den trainingsabhängigen Anstieg der *de novo* Proteinsynthese gezeigt werden (Yu et al., 2020a).

Da wir bereits eine veränderte trainingsabhängige IEG-Expression im Hippocampus nachweisen konnten und eine IGF-II-Injektion in den Hippocampus den Gedächtnisdefekt in den heterozygoten Mäusen verbessern konnte, sollte der Einfluss von IGF-II auf die Expression der IEGs *c-fos* und *zif268* im Hippocampus nachgewiesen werden. Dazu durchliefen *Tsc2*^{+/-}-Tiere und wildtypische Geschwistertiere wie bereits in 3.3.3.1 beschrieben, den 7d NORT mit einer bilateralen IGF-II-Injektion bzw. einer Vehikelinjektion in den dorsalen Hippocampus. Innerhalb von 60 Minuten nach der Testphase an Tag 9 wurden die Hippocampi isoliert und daraus RNA extrahiert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der IEGs *c-fos* und *zif268* im Hippocampus, sowohl in IGF-II- als auch Vehikel-injizierten Tieren, untersucht. Wie in Abbildung 57 zu erkennen, konnte für das IEG *c-fos* nach IGF-II-Behandlung ein signifikanter Anstieg der *c-fos*-mRNA-Expression in heterozygoten Tieren im Vergleich zu Vehikel-behandelten heterozygoten Tieren detektiert werden (Abb.57 A). Dadurch entspricht das Expressionsniveau von *c-fos* von *Tsc2*^{+/-}-Tieren nach IGF-II-Injektion dem der wildtypischen Geschwistertiere. Für *zif268* konnte weder in der PBS-Kontrollgruppe noch in den IGF-II behandelten Tieren ein signifikanter Unterschied zwischen *Tsc2*^{+/-}-Tieren und wildtypischen Geschwistertieren festgestellt werden (Abb.57 B). Somit konnte weder das Ergebnis der vorangegangenen Studien reproduziert noch ein Expressionsanstieg nach IGF-II Behandlung verzeichnet werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, wie bereits durch frühere Studien vermutet, der Wachstumsfaktor IGF-II einen positiven Effekt auf die Gedächtnisleistung bei alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen hat, welcher womöglich durch den Einfluss von IGF-II auf die trainingsabhängige Expression des IEGs *c-fos* im Hippocampus begründet ist.

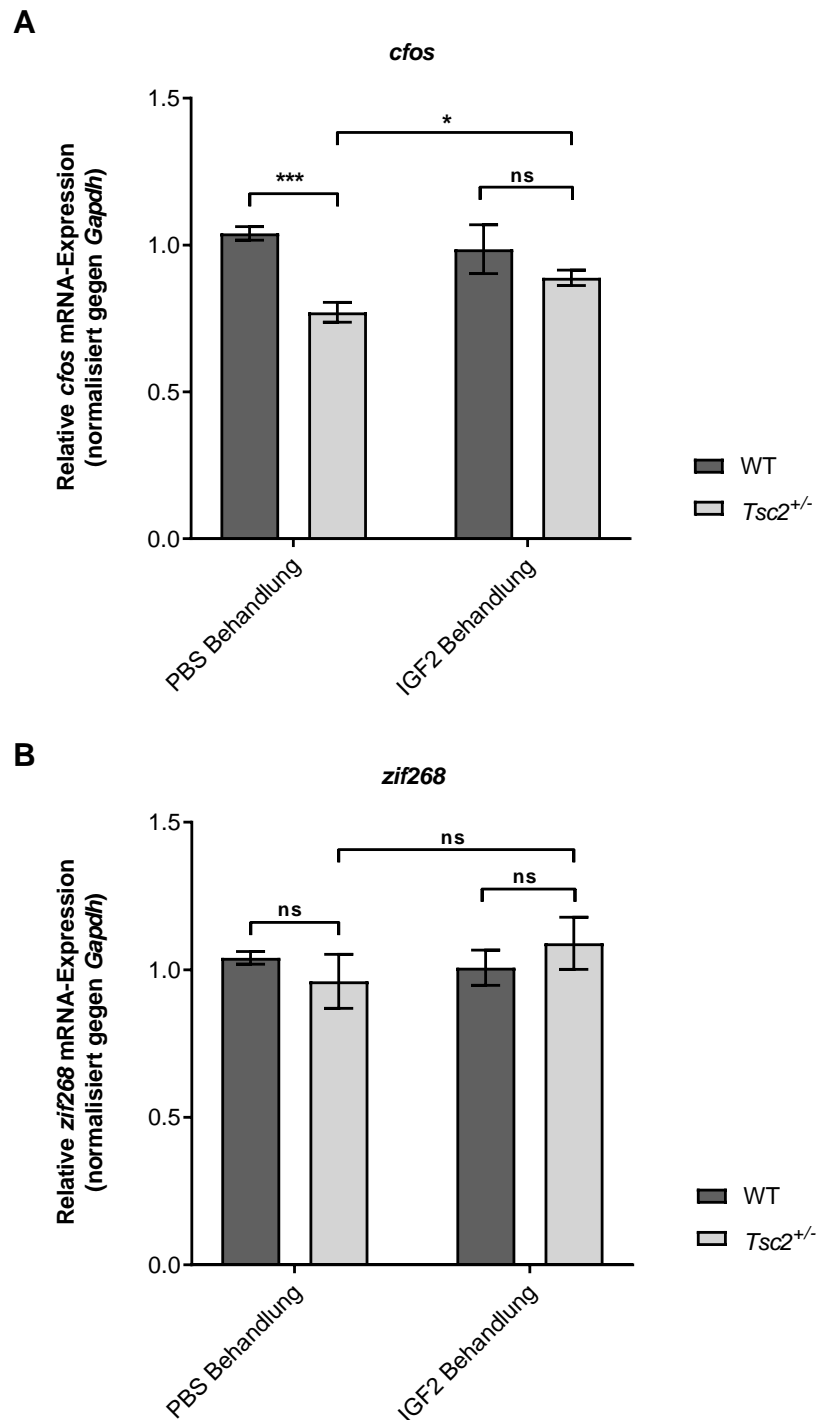


Abbildung 57: Relative mRNA-Expressionsniveaus von *c-fos* und *zif268* im Hippocampus alternder *Tsc2*^{+/-}- Mäuse sowie wildtypischer Geschwistertiere nach IGF-II- vs. PBS-Behandlung. Relative mRNA-Expression von *c-fos* (A) und *zif268* (B); während die Expression von *c-fos* nach IGF-II-Injektion in den heterozygoten *Tsc2*-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht wurde, war kein signifikanter Unterschied in *Tsc2*^{+/-}- Mäusen vergleichend zum Wildtyp für *zif268* – weder in der Kontrollgruppe noch nach IGF-II-Behandlung – zu erkennen. Die Werte wurden gegen *Gapdh* normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von Excel.

4 Diskussion

Eine Dysregulation des mTOR-Signalweges gilt als die Hauptursache für verschiedene neurologische Störungen, inklusive Autismus-Spektrum-Störungen oder Intelligenzminderung. Mutationen einzelner Gene können zu syndromalen Formen von Autismus und geistiger Behinderung führen. Je nach dem betroffenen Gen und der individuellen Kompensationsfähigkeit ist die klinische Variabilität der mTOR-gekoppelten Erkrankung hoch und nicht alle Patienten zeigen das volle Spektrum der Symptome. Die Tuberoöse Sklerose (TS) ist eine Multisystemerkrankung, die unter anderem mit einer Funktionsstörung des Gehirns einhergeht, welche geistige Behinderung und Autismus einschließt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konventionelles heterozygoten Mausmodell für TS verwendet, um die molekularen Mechanismen einer mTOR Dysregulation in Zusammenhang mit Autismus und geistiger Behinderung longitudinal aufzuschlüsseln und einen möglichen neuen Therapieansatz für TS und womöglich auch andere, mit ähnlichen Symptomen assoziierte monogene Erkrankungen zu entwickeln.

4.1 Phänotypische Längsschnittanalyse des heterozygoten *Tsc2*-Mausmodells

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten einer heterozygoten *Tsc2*-Mauslinie longitudinal charakterisiert. Dazu durchliefen männliche *Tsc2*^{+/-}-Mäuse und wildtypische Geschwistertiere eine Verhaltensbatterie im Alter von 2, 3-4 und 8-10 Monaten. Untersucht wurde hinsichtlich repetitiver Verhaltensmuster sowie sozialer und kognitiver Defizite. Die phänotypische Längsschnittanalyse konnte zeigen, dass sich der pathologische Phänotyp, ähnlich wie bei Patienten mit Tuberoöser Sklerose, stufenweise aufbaut, beginnend mit autistischen Verhaltensmustern wie der übersteigerten Fellpflege im Alter von 2 Monaten, gefolgt von Beeinträchtigungen im Sozialverhalten im Alter von 3-4 Monaten, endend in subtilen kognitiven Störungen der Gedächtniskonsolidierung und des episodischen Gedächtnisses im Alter von 8-10 Monaten. Während in der Literatur bislang nur Verhaltensstudien mit *Tsc1*^{+/-} oder *Tsc2*^{+/-}-Mäusen zu einzelnen Zeitpunkten publiziert sind, wurde sich im Rahmen unserer Studien erstmalig speziell auf die Progression der Auffälligkeiten fokussiert. Vergleichend mit den bereits veröffentlichten Daten in *Tsc2*^{+/-}-Mausmodellen ergeben sich aus den vorliegenden Daten einige Kontroversen, welche nachfolgend näher erläutert werden.

2008 führten Ehinger et al. detaillierte Verhaltensstudien in 3-6 Monate alten Tieren durch. Dabei wurden sowohl Männchen als auch Weibchen des verwendeten Inzuchtstamms C57BL/6NCrl innerhalb einer Kohorte verwendet. Sie konnten zeigen, dass 3-6 Monate alte *Tsc2*^{+/-}-Tiere sowohl Defizite im räumlichen Lernen als auch in

drei verschiedenen Hippocampus-abhängigen Verhaltenstests aufweisen (Ehninger et al., 2008b). Das explorative Verhalten sowie auch die soziale Interaktionsfähigkeit und das Angstverhalten waren hingegen unauffällig, was darauf schließen lässt, dass sich kein Autismus-ähnlicher Phänotyp erkennen ließ, kognitive Defizite allerdings schon im Alter von 3-6 Monaten präsent sind. Sato et al. testeten 2012 sowohl *Tsc1*^{+/-} - als auch *Tsc2*^{+/-} -Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6J, Weibchen und Männchen, innerhalb derselben Kohorte im Alter von 8-10 Wochen, und konnten entgegen den Studien von Ehninger et al. in beiden Mauslinien unabhängig des Geschlechts signifikante Defizite in der sozialen Interaktionsfähigkeit feststellen, wohingegen in keiner Gruppe kognitive Beeinträchtigungen bei der Erkennung neuartiger Objekte zu verzeichnen waren (Sato et al., 2012). In einer dritten vergleichenden Verhaltensstudie testeten Tang et al. 2014 *Tsc2*^{+/-} -Männchen des Inzuchtstamms C57BL/6J im Alter von 30 bis 35 Tagen, wobei diese weder Anomalien im Angstverhalten noch erhöhtes repetitives Verhalten zeigten, jedoch die soziale Interaktionsfähigkeit beeinträchtigt schien (Tang et al., 2014b). Im Test zur Erkennung neuartiger Objekte verbrachten die *Tsc2*^{+/-} - Mäuse weniger Zeit mit der Erforschung des neuartigen Objekts als ihre wildtypischen Geschwistertiere, was zusätzlich auf sehr frühe kognitive Defizite schließen lässt.

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass sich Autismus-ähnliche Verhaltensmuster von *Tsc2*^{+/-} -Männchen des Inzuchtstamms C57BL/6J bereits im Alter von 2 Monaten in Form von erhöhtem repetitivem Verhalten entwickeln und im Alter von 3-4 Monaten durch eine gestörte soziale Interaktionsfähigkeit erweitert werden, während erst später (8-10 Monate alte Tiere) kognitive Defizite erkennbar waren. Diese Diskrepanz im Verhalten könnte auf Unterschiede in den Testprotokollen, dem Geschlecht, dem Alter, dem genetischen Hintergrund der Versuchsmäuse oder aber auch der Zuchtbedingungen zurückzuführen sein. Beim Vergleich der bereits publizierten Studien sowohl untereinander als auch mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie fällt auf, dass sich die Versuchsprotokolle in wesentlichen Punkten unterscheiden. Als erstes ist anzumerken, dass zur Untersuchung einzelner Verhaltensdomänen unterschiedliche Testprotokolle verwendet wurden. Während beispielsweise in den Studien von Ehinger und Tang zur Untersuchung der sozialen Interaktion der 3-Kammer-Test für soziale Interaktion verwendet wurde, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie ein 1-Kammer-Test für soziale Interaktion verwendet. Weiterhin spielt bei der Durchführung der einzelnen Tests nicht nur das Testprotokoll selbst, sondern auch der Einfluss durch Umgebungskonditionen wie beispielsweise die Unterbringung der zu untersuchenden Tiere oder die Tageszeit der Messung eine entscheidende Rolle. Weiterhin ist anzumerken, dass sowohl Ehninger als auch Sato in ihren Studien ausschließlich Mäuse des gleichen Geschlechts innerhalb derselben Kohorte testeten. Da bekannt ist, dass in Verhaltensstudien mit Nagetieren die Verwendung von Weibchen zu einer höheren

Variabilität der Ergebnisse, bedingt durch deren Östruszyklus, führen kann (Gray & Cooney, 1982; Walf et al., 2009), könnte dies eine weitere Erklärungen für Diskrepanzen zwischen den Studien sein. Weitere wichtige Faktoren beim Vergleich verschiedener Verhaltensstudien ist sowohl der genetische Hintergrund als auch der verwendete Inzuchtstamm. Wie auch bei Patienten hat die zugrundeliegende genetische Mutation erheblichen Einfluss auf Variabilität und Ausprägung des Phänotyps. Im Vergleich der drei aufgeführten Studien mit der vorliegenden Studie ist anzumerken, dass nur Ehinger et al. das gleiche Knockout-Modell wie in der vorliegenden Studie nutzten (Ehninger et al., 2008b; Onda et al., 1999), wobei hier anzumerken ist, dass Mäuse in Ehninger et al. den Inzuchtstamm C57BL/6NCrl verwendeten, während die Mauslinie der vorliegenden Studie auf dem C57BL/6J Inzuchtstamm begründet war. Es ist bereits mehrfach publiziert, dass sowohl die unterschiedlichen Mausstämme als auch die einzelnen Substämme selbst unterschiedliche phänotypische Ausprägungen zeigen können (Radulovic et al., 1998; Roderick, 1978; Stiedl et al., 1999), weswegen Diskrepanzen im Verhalten zwischen unterschiedlichen Substämmen durchaus auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen sein können. Nicht zuletzt hat das Alter der Versuchstiere große Auswirkungen auf die publizierten Verhaltensexperimente. Als bester Beweis dafür dient die vorliegende Studie, in der gezeigt wurde, dass Verhaltensanalysen zu einzelnen Zeitpunkten den Aspekt der Progression außer Acht lassen und somit nur eine phänotypische Momentaufnahme generiert werden kann. Sato et al. postulierten, dass innerhalb des von ihnen untersuchten Mausmodells keine kognitiven Defizite zu verzeichnen waren. Diese Aussage beruht auf Testungen, die im Alter von 8-10 Wochen durchgeführt wurden. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der kognitive Defizite erst sehr spät gefunden wurden, wäre anzumerken, dass das Mausmodell in Sato et al. nicht generell keinen kognitiven Phänotypen zeigt, sondern dieser womöglich zum untersuchten Zeitpunkt nur noch nicht präsent war. Bezugnehmend auf die sehr frühen kognitiven Defizite in der Studie von Tang et al. könnte diese Abweichung zu unseren vorliegenden Daten auch durch Störfaktoren während der Aufzucht zu begründen sein. Es ist bekannt, dass beispielsweise frühzeitiger chronischer Stress zu Beeinträchtigungen im hippocampus-abhängigen Lernen und der Gedächtnisfunktion in älteren Mäusen führen kann (Rice et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drei aufgeführten Studien nur bedingt mit der vorliegenden Studie vergleichbar sind, da sich sowohl die Versuchsprotokolle als auch die verwendeten Tiere in mindestens einem der diskutierten Parameter voneinander unterscheiden, welches die Diskrepanz der Daten erklären könnte.

Vorherige Verhaltensstudien in unserem Institut mit demselben Mausmodell konnten bereits Defizite im Hippocampus-abhängigen Lernen ausschließen. Eher kristallisierte sich ein sehr stabiler, wenn auch subtiler kognitiver Phänotyp in alternden *Tsc2*^{+/-} - Tieren heraus, welcher auf Defiziten im 7d NORT und der episodischen Gedächtnisbatterie

begründet ist. Daraus lässt sich schließen, dass in unserem Mausmodell nicht das Hippocampus-abhängige Lernen, sondern viel mehr die Festigung der erlernten Gedächtnisinhalte – die so genannte Konsolidierung – betroffen ist. Dies lässt sich vor allem daran sehen, dass der Hippocampus-basierte 24h NORT keine Defizite zeigte – hier waren die heterozygoten *Tsc2*-Mäuse in der Lage, neue Inhalte in einer zweitägigen Trainingsphase zu erlernen und diese 24 Stunden später wieder abzurufen. Wird die Zeitspanne zwischen Lernen und Abrufen jedoch verlängert – wie in dem von uns etablierten 7d NORT – so fällt auf, dass die heterozygoten alten Tiere nicht in der Lage sind, sich an das zuvor Erlernte zu erinnern. Bislang wurde die Gedächtniskonsolidierung sowie auch Defizite im episodischen Gedächtnis zusammenhängend mit Mutationen im *Tsc1* oder *Tsc2* Gen nur in Ratten untersucht, nicht aber in Mäusen. Übereinstimmend mit unseren Daten konnten beispielsweise bereits in Ratten Defekte im episodischen Gedächtnis nachgewiesen werden (Steele & Morris, 1999).

Weiterhin bleibt noch unklar, zu welchem Zeitpunkt genau sich der kognitive Phänotyp entwickelt. Unsere Daten zeigen die Defizite in 8-10 Monate alten Tieren, wobei 3-4 Monate alte Tiere noch nicht betroffen sind. Ein weiterer Zeitpunkt, beispielsweise 6 Monate, wäre nötig, um das Zeitfenster der kognitiven Phänotyp-Entstehung noch weiter einzugrenzen. Abschließend lässt sich sagen, dass das Ergebnis der durchgeführten phänotypischen Längsschnittanalyse vor allem in Hinblick auf Progression und Ausprägung ganz gut mit dem klinischen Bild von TS-Patienten harmoniert und ein gutes Modell bietet, die zugrundeliegenden molekularen Ursachen zu untersuchen.

4.2 Dysregulation synaptischer und Autismus-assoziiertes Proteine als molekulare Grundlage der Autismus-ähnlichen Verhaltensauffälligkeiten in *Tsc2*^{+/-}-Tieren

4.2.1 Phänotypische Auffälligkeiten entwickeln sich unabhängig vom primären Gendefekt

Um die molekularen Ursachen der autistischen Verhaltensauffälligkeiten näher zu beleuchten und aufzuklären, wurde eine vergleichende Proteomanalyse von kortikalen Homogenaten und Synaptosomen zu verschiedenen Zeitpunkten vom frühen bis zum späten postnatalen Stadium mittels serieller Western-Blot- und Massenspektrometrie-Analysen durchgeführt. Zu allererst sollte die *Tsc2*-Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden. Die TS ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch heterozygote Mutationen in den Genen *TSC1* oder *TSC2* verursacht wird. Bei der in der vorliegenden Dissertationsschrift verwendeten Mauslinie wurde Exon 2 des *Tsc2*-Gens durch eine Neomycinkassette ersetzt, wodurch die Genexpression heterozygot gestört wird. Somit würde die *Tsc2*-Genexpression nur von dem gesunden Allel

ausgehen, weswegen bei der Analyse des Proteinexpressionsniveaus auch eine reduzierte Expression um bis zu 50% zu erwarten wäre. Bei der Analyse des Tsc2-Proteinexpressionsniveaus in primären Neuronen zum Zeitpunkt E14.5 sowie in kortikalen Homogenaten zu den Zeitpunkten P10 und P17 konnte eine signifikante Verringerung der Tsc2-Proteinexpression in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern festgestellt werden. In allen späteren Stadien scheint die reduzierte Expression von Tsc2 in den *Tsc2*^{+/-}-Tieren kompensiert zu sein. Zusätzlich dazu konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine Veränderung der Phosphorylierung der mTOR-Zielproteine phospho-S6 sowie phospho-Akt detektiert werden. Diese Daten sind nicht nur kontrovers zu den Erwartungen aufgrund der genetischen Mutation, sondern auch kontrovers hinsichtlich der publizierten Literatur. Bislang konnte in jeder Studie unter Verwendung eines heterozygoten *Tsc2*-Mausmodells sowohl eine Reduktion der Tsc2-Proteinexpression als auch eine Hyperphosphorylierung der mTOR-Zielproteine individuell zu spezifischen Zeitpunkten nachgewiesen werden (Ehninger et al., 2008b; Sato et al., 2012).

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse können hinsichtlich der unerwarteten nicht veränderten Tsc2-Expressionslevel ab Zeitpunkt P25 kompensatorische Mechanismen vermutet werden, beispielsweise durch das gesunde *Tsc2*-Allel oder aber unabhängig vom Gendefekt durch die Transkriptions-/Translationsmaschinerie. Dafür wäre es interessant und notwendig, die Tsc2-Expression nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf mRNA-Ebene an verschiedenen Zeitpunkten – vor allem ab dem Zeitpunkt P25 – zu untersuchen. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob die Genexpression von *Tsc2* durchgehend und beständig um die Hälfte reduziert vorliegt, was gegen eine Kompensation durch das intakte Allel und für eine Regulation auf Transkriptions-/Translations-Ebene sprechen würde. Kompensatorische Mechanismen, die zu einer Erhöhung der mRNA durch das gesunde wildtypische Allel führen würden, könnten durch eine verbesserte mRNA-Stabilität bzw. durch transkriptionelle Modifikation begründet sein. Eine mögliche Modifikation wäre beispielsweise das sogenannte Capping, bei dem das 7-Methyl-Guanosin am 5'-Ende der prä-mRNA synthetisiert wird, was die Stabilität und die spätere Translation der RNA beeinflusst, indem die Anlagerung der fertigen mRNA an das Ribosom in der Translation erleichtert wird. Weiterhin kann die Stärke der Transkription auch von der Effizienz des Polyadenylierungsmechanismus abhängen, denn wenn die Anheftung des Poly(A)-Schwanzes fehlerhaft ist, wird die mRNA nicht im Zellkern angehäuft, sondern schnell abgebaut. Auch können RNA-bindende Proteine sowie micro-RNAs als regulatorische Einheiten Einfluss auf die RNA-Stabilität sowie die Effizienz der Translation haben. Somit wäre es interessant, die spezifischen Enzyme, welche im Rahmen dieser mRNA-abbauenden Maschinerie wirken, sowie auch RNA-bindende Proteine auf Veränderungen in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen über die Zeit hinweg zu untersuchen. Kompensatorische

Mechanismen, die ohne eine Erhöhung der wildtypischen mRNA greifen, würden auf translationaler Ebene stattfinden. Beispielsweise wäre es möglich, dass die mRNA-abbauende Maschinerie das homöostatische Ungleichgewicht der verminderten Tsc2-Proteinexpression dahingehend ausgleicht, als dass die mRNA länger translatiert wird (Parker & Song, 2004; Schoenberg & Maquat, 2012). Bekanntlich kann eine mRNA so lange zur Herstellung von Proteinen benutzt werden, wie sie sich im Zytoplasma befindet; sobald die Zelle aber das betreffende Protein in ausreichender Menge hergestellt hat, muss die dazugehörige mRNA wieder abgebaut werden. Auch posttranslationale Modifikationen wie Deubiquitinierung oder Phosphorylierung von Proteinen des mTOR Signalweges könnten zu einer Vermeidung des Proteinabbaus und einer erhöhten Tsc2-Proteinverfügbarkeit führen.

Im Rahmen einer weiteren Studie konnten wir bereits eine reduzierte mRNA-Expression in den *Tsc2*^{+/-}-Tieren zum Zeitpunkt E.14.5 nachweisen, wobei diese Reduktion durch epigenetische Modulatoren *in vitro* verbessert und die Expression wieder auf Wildtyp-Niveau gebracht werden konnte. Eine Studie unseres Instituts konnte bereits zeigen, dass eine epigenetische Modulation (imprinting Mutation) mit Histon-Methyltransferase- (EHMT) oder Histon-Deacetylase- (HDAC) Inhibitoren das intakte Allel bei autosomal-dominanten Imprinting-Erkrankungen wie dem Birk-Barel-Syndrom (Cooper et al., 2020) aktivieren kann, was folglich den durch die Mutation verursachten Mangel an Expression ausgleicht und zur Rettung des Krankheitsphänotyps führt. Obwohl es sich bei TS nicht um eine Imprinting-Erkrankung handelt, ist ein ähnlicher Ansatz denkbar. Unsere vorläufigen *in vitro*-Daten deuten darauf hin, dass eine exogene epigenetische Stimulation zu frühen Zeitpunkten die *Tsc2*-Expression durch das intakte Allel erhöhen und die spätere Entwicklung des Phänotyps abschwächen oder womöglich ganz vermeiden könnte. Dies könnte ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein, der nicht nur bei TS, sondern auch bei anderen autosomal-dominanten Krankheiten Wirkung finden könnte.

Hinsichtlich der nicht veränderten Expressions- und Phosphorylierungslevel der mTOR-Zielgene könnte hier auch ein technisches/ methodisches Problem zugrunde liegen. Die Analyse von Proteinphosphorylierungsvorgängen und abweichenden Phosphorylierungsniveaus mittels Western Blot ist nicht trivial und abhängig von Temperaturen, Puffern und Lagerungszeit der zu untersuchenden Lysate. Es ist bekannt, dass die Zerstörung von Zellmembranen Enzyme freisetzt, die Proteine abbauen und/oder dephosphorylieren können. Selbst unter Verwendung von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren kann vor allem eine längere Lagerung oder Lagerung generell dazu führen, dass Proteine dephosphoryliert und demnach deren ursprünglicher Phosphorylierungsstatus nicht mehr detektiert werden kann. In weiteren Studien sollte bestenfalls das Protokoll zur Lysatherstellung und Blotting speziell auf die Analyse phosphorylierter Proteine optimiert werden. Da der mTOR-Signalweg neben der

Translation auch die Makroautophagie reguliert, wäre es möglich, zusätzlich zu phospho-S6 und phospho-Akt auch Marker hinsichtlich Makroautophagie zu inkludieren, wie beispielsweise die Serin/Threonin-Proteinkinase unc-51-like autophagy activating kinase 1 (ULK1), ein Enzym, das für die Einleitung der Autophagie erforderlich ist (T. Hara et al., 2008) oder auch die AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), die direkt an ULK1 bindet und die Autophagie aktiviert. Darüber hinaus wäre es auch wichtig, mTOR und phospho-mTOR selbst in die Analysen aufzunehmen, um eine Hyperaktivität von mTOR durch die Tsc2 Mutation nachweisen zu können. Weiterhin könnte auch eine andere Methode zum Nachweis der vermutlich durch den hyperaktiven mTOR-Signalweg erhöhten Translation in Betracht gezogen werden. Es ist beispielsweise möglich, die Geschwindigkeit der aktiven Translation in bestimmten Hirnregionen *in vivo* mit der SUNSET-Technik nachzuweisen (Schmidt et al., 2009). Diese Methode basiert auf der Messung des Puromycin-Einbaus in neu synthetisierte Proteine. Andererseits könnte hier auch ein Verdünnungseffekt vorliegen, der durch die Analyse von kortikalen Gesamtlysaten verursacht wird und die einer mTOR-Hyperaktivität auf Einzelzellebene nicht gerecht wird. Um dieses Problem zu lösen, müsste man Immunhistochemieprotokolle etablieren, über die die Phosphorylierung und die Expressionsstärke von mTOR-Zielproteinen auf Einzelzellebene in Schnitten untersucht werden kann (vgl. Harter et al., 2015; Mandell, 2008; Mueller et al., 2011; Newton et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Tsc2-Proteinexpression ab Zeitpunkt P17 vermutlich aufgrund homöostatischer Anpassungsprozesse kompensiert wird. Die Entwicklung des Autismus-ähnlichen Phänotyps ab dem zweiten Monat ist somit unabhängig vom primären Gendefekt.

4.2.2 Dysregulation synaptischer Rezeptorproteine in frühen postnatalen Stadien der Gehirnentwicklung

Als molekulare Ursache für die Entstehung von Autismus und Intelligenzminderung in Patienten mit TS wird in der Literatur einerseits das Vorhandensein kortikaler Tubera, andererseits die frühkindlichen Krampfanfälle diskutiert (Bolton et al., 2002; Holmes et al., 2007; Humphrey et al., 2014). Beispielsweise konnten Bolton und Griffiths bereits 1997 zeigen, dass sowohl TS-Patienten mit Autismus als auch die mit Intelligenzminderung eine signifikant höhere Anzahl an Tubera im Temporallappen aufweisen als TS-Patienten ohne neurologische Symptome (Bolton & Griffiths, 1997). In einer Studie von Cusmai et al. wurde beschrieben, dass eine frühe Behandlung der Krampfanfälle mit Vigabatrin auch Auswirkungen auf die Verringerung der Häufigkeit anderer neuropsychiatrischer Symptome in TS-Patienten haben könnte (Cusmai et al., 2011). Während der in der vorliegenden Dissertationsschrift durchgeführten longitudinalen Verhaltensstudie konnte zu keinem Zeitpunkt Krampfanfälle in

heterozygoten *Tsc2*-Mäusen beobachtet werden. Dies geht mit den Beobachtungen aus der Studie von Ehninger et al. einher, die in ihrem TS-Mausmodell ebenfalls zu keiner Zeit Krampfanfälle oder Tubera im Gehirn heterozygoter *Tsc2*-Mäuse nachweisen konnten (Ehninger et al., 2008a). Das lässt darauf schließen, dass andere Mechanismen ursächlich für die Ausbildung des Verhaltensphänotyps sein müssen.

Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand kann vermutet werden, dass eine Dysregulation synaptischer Rezeptoren und den damit einhergehenden Veränderungen des exzitatorischen/ inhibitorischen (E/I) Gleichgewichts eine Rolle bei der Entwicklung von ASS spielen können. Die Aufrechterhaltung eines angemessenen E/I-Gleichgewichts ist notwendig, um neuronalen Schaltkreise zu stabilisieren sowie eine Überbeanspruchung des Netzwerks und eine Verschiebung in Richtung Übererregbarkeit zu verhindern (Monday et al., 2018). Eine normale Hirnentwicklung fordert insbesondere deswegen ein angemessenes E/I-Gleichgewicht, da beispielsweise eine vorherrschende Stärke der GABA-ergen Synapsen zu einer Verhinderung der Synaptogenese führt, während andererseits eine vorherrschende glutamaterge Übertragung in Exzitotoxizität resultieren kann (Ben-Ari, 2002). Es ist bekannt, dass Ereignisse wie beispielsweise ein gestörtes E/I-Gleichgewicht während kritischer embryonaler und postnataler Perioden der Gehirnentwicklung Auswirkungen auf die Funktion des adulten Gehirns haben können. Dabei sind vor allem Phasen der Synaptogenese, Apoptose, der synaptischen Beschneidung sowie der Myelinisierung im Gehirn anfällig für selbst kleinste Störungen, welche trotz effizienter Kompensationsmechanismen zu abnormalen Funktionen und letztlich zu kognitiven und autistischen Beeinträchtigungen sowie auch anderen neuropsychiatrischen Störungen führen können (Chini & Hanganu-Opatz, 2021). In Übereinstimmung damit wurde eine Störung des E/I-Gleichgewichts in die Pathophysiologie von ASS angenommen, was durch Daten von menschlichen Patienten und Tiermodellen untermauert werden konnte (Antoine et al., 2019; Bozzi et al., 2018; Gogolla et al., 2009; Horder et al., 2018; Sohal & Rubenstein, 2019).

Maßgeblichen Einfluss auf das E/I-Gleichgewicht kann der mTOR-Signalweg haben, da dieser eine essenzielle Rolle für die lokale Proteinsynthese im postsynaptischen Kompartiment spielt und dadurch die synaptische Plastizität reguliert. In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Studie eine vergleichende Proteomanalyse kortikaler Homogenate und Synaptosomen zu verschiedenen Zeitpunkten von der frühen bis zur späten postnatalen Phase mittels serieller Western Blot- und Massenspektrometrieanalyse durchgeführt, wobei das Zeitfenster von der Geburt bis zu Entwicklung der Autismus-ähnlichen Verhaltensauffälligkeiten abgedeckt wurde. Interessanterweise konnten zwei zeitliche Fenster definiert werden, in denen es zu bedeutenden Fehlregulationen in der Expression postsynaptischer Rezeptoren kommt: zum ersten um den Zeitpunkt P5 sowie zum zweiten zwischen P17 und P28. Während zum Zeitpunkt der Geburt und auch an P2 noch keine signifikanten Dysregulationen zu verzeichnen sind, zeigten fast alle

untersuchten Proteine zum Zeitpunkt P5 in den Synaptosomen eine signifikante Herunterregulation in den heterozygoten *Tsc2*-Tieren, während in den Homogenaten die Proteinexpression unverändert ist. Zum Zeitpunkt P8 scheint die Proteinexpression jedoch wieder weitestgehend normal reguliert zu sein. Dabei stellt der Zeitraum zwischen P5 und P8 eine wichtige Phase während der Synaptogenese dar. Eine longitudinale Studie von Li et al., in der sowohl prä- als auch postsynaptische Kompartimente hinsichtlich synaptogener Prozesse elektronenmikroskopisch untersucht wurden, konnten zeigen, dass typische reife synaptische Strukturen erst zum Zeitpunkt P7 auftraten; danach konnten synaptische Strukturen mit normal großen präsynaptischen Vesikeln und einem reifen synaptischen Spalt identifiziert werden (M. Li et al., 2010). Um die Synaptogenese vollständig zu untersuchen, analysierten Li et al. ebenfalls Synapsin und Synaptophysin, welche die wichtigsten Proteine der synaptischen Vesikelmembranen an praktisch allen präsynaptischen Endigungen darstellen, da sie sich mit synaptischen Vesikeln verbinden und die Freisetzung von Neurotransmittern regulieren. Einhergehend mit anderen Studien konnten sie nachweisen, dass die Expression von Synaptophysin ab E18 rapide ansteigt, bis sie zum Zeitpunkt P14 ihr Plateau erreicht, woraus sie schließen, dass der größte Teil der Synaptogenese in den ersten beiden Wochen der postnatalen Periode im murinen Cortex abgeschlossen ist. Eine signifikante Herunterregulation postsynaptischer Rezeptorproteine während dieser kritischen Phase könnte somit für eine zeitlich terminierte, verzögerte Synaptogenese sprechen, wobei die Proteinverfügbarkeit in der Gesamtzelle zwar gegeben zu sein scheint (da im Homogenat kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war), jedoch eine Verfügbarkeit an der Postsynapse womöglich noch nicht in normalem Maße gewährleistet ist. Eine Erklärung dafür könnte eine Störung des Proteintransports zum bzw. der Rezeptorfreisetzung von der Postsynapse in den synaptischen Spalt bzw. die synaptische Membran sein. Bislang konnte in mehreren Studien der Einfluss von mTOR auf den Transport von Proteinen (Koscielny et al., 2021) bzw. deren endo- sowie auch exozytotische Freisetzung (Grahammer et al., 2017) nachgewiesen werden. Eine Fehlregulation von mTOR könnte möglicherweise entweder den Transport der Rezeptorproteine von den Ribosomen bzw. dem Golgi-Apparat hin zur postsynaptischen Membran stören bzw. verlangsamen, oder aber die exozytotisch vermittelte Rezeptorfreisetzung in die postsynaptische Membran beeinflussen. Um dieser Hypothese nachzugehen, könnten nachfolgende Studien beispielsweise Störungen hinsichtlich Proteintransport, Exo- und Endozytose sowie auch die Expression von präsynaptischen Proteinen wie Synapsin und Synaptophysin untersuchen, um den zugrundeliegenden Mechanismus für eine derart prominente Herunterregulation aller untersuchter postsynaptischer Proteine näher zu beleuchten. Eine Fehlregulation während einer derart kritischen Phase der Synaptogenese kann sehr wahrscheinlich drastische Auswirkungen auf das E/I-Gleichgewicht für den weiteren Verlauf haben. Im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt P17 scheint die postsynaptische

Rezeptorkomposition im Cortex heterozygoter *Tsc2*-Mäuse weitestgehend unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen zu sein. Während P8 eine signifikante Veränderung im Verhältnis der beiden AMPA-Rezeptoren GluA1 zu GluA2 zueinander mit einer Verschiebung in Richtung GluA1 in den Synaptosomen zeigt, so ist an Tag P10 eine signifikante Herunterregulation von GABABR2 im Homogenat zu erkennen. Wichtig wäre hier, in Folgestudien zusätzlich auch eine bestimmte Variation präsynaptischer Proteine zu inkludieren, um eine vollständige Aussage bezüglich einer Störung des E/I-Gleichgewichts machen zu können, da postsynaptische Veränderungen meistens auch mit präsynaptischen Veränderungen einhergehen. Der nächste deutliche Einbruch der kortikalen Rezeptorregulation ist ab P17, vor allem aber zwischen P25-P28 zu erkennen. Nahezu alle postsynaptischen Rezeptoren zeigen eine signifikante Hochregulation in den Homogenaten, während in den Synaptosomen durchschnittlich weniger Fehlregulationen zu sehen sind. Sowohl die AMPA-Rezeptoren GluA1 und GluA2 als auch GABA-Rezeptoren GABABR1 und GABABR2 sowie GABAA α 1 zeigen eine Überexpression im Homogenat, zwischen P25 und 3 Monaten, währenddessen nur GABABR2 an P25 und GluA2 an P28 eine signifikante Hochregulation in den Synaptosomen zeigen. Dies kann weiterhin als homöostatischer Kompensationsmechanismus als Antwort auf frühere Fehlregulationen zu sehen sein, wobei die Zellen die Synapsen vor stärkeren Perturbationen zu schützen scheinen. Weiterhin kann auch dies durch Anomalien in der Proteinverfügbarkeit der Neurone erklärbar sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mTOR nicht nur einen Einfluss auf die Proteintranslation, sondern auch auf die Proteindegradierung haben kann. Genauer gesagt fand eine Studie von Zhao et al. heraus, dass die Hemmung von mTOR den Gesamtproteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System rasch erhöht, indem die Ubiquitinierung vieler Zellproteine verstärkt wird (Zhao et al., 2015). Würde man also in unserem Fall von einem hyperaktiven mTOR im TS-Mausmodell ausgehen – was, wie bereits diskutiert, noch abschließend geklärt werden müsste – so könnte dies zu einer Hemmung bzw. Reduktion des Proteinabbaus und dadurch zu einer erhöhten Proteinverfügbarkeit in der Gesamtzelle führen. Dies müsste zusätzlich durch Untersuchungen hinsichtlich einer gestörten Ubiquitinierungs-Maschinere, Proteindegradierung und Autophagie geklärt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass schon während der frühen Gehirnentwicklung als Folge des primären *Tsc2*-Gendefekts Fehlregulationen in der Expression postsynaptischer Rezeptoren in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen auftreten, welche zu einer Störung des neuronalen Netzes beziehungsweise des neuronalen Gleichgewichts führen können, was wiederum zu mal-adaptiven Konsequenzen kompensatorischer Prozesse führen und ursächlich für die Ausbildung des Phänotyps sein könnte.

4.2.3 Dysregulation des Neuroligin/ Neurexin-Systems während der Entwicklung des autistischen Phänotyps

Ebenso vielfältig wie die klinischen Ausprägungen von ASS sind deren mögliche Ursachen. Kopplungsstudien und Screening-Experimente konnten Mutationen in bestimmten Genen identifizieren, die verantwortlich für ASS und der Gruppe der penetranten monogenetischen Mutationen zuzuordnen sind. Dazu zählen unter anderem Neuroligin-3 (NLGN3) und Neuroligin-4 (NLGN4), Neurexin-1 (NRXN1), sowie auch verschiedene PROSAP/SHANK Gene (Alarcón et al., 2008; J. Feng et al., 2006; Jamain et al., 2003; Tromp et al., 2020), welche schon seit vielen Jahren als Hauptverdächtige in der Autismusforschung gelten. Mutationen in diesen Genen sind bekannt dafür, Einfluss auf die synaptische Funktion, Synaptogenese und die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Eingängen (E/I-Balance) zum Neuron auszuüben (Bourgeron, 2009). Neuroligine sind vorwiegend postsynaptisch lokalisierte Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domänen sich unter anderem mit den präsynaptisch lokalisierten Neurexinen verbinden. Darunter findet sich Neuroligin-1 an exzitatorischen, glutamatergen Synapsen (Dong et al., 2007), Neuroligin-2 an inhibitorischen, GABA-ergen Synapsen (Varoqueaux et al., 2004) und Neuroligin-3 sowohl an exzitatorischen als auch inhibitorischen Synapsen (Budreck & Scheiffele, 2007; Trobiani et al., 2020). Die transsynaptischen Neuroligin-Neurexin-Komplexe regulieren durch die Rekrutierung von prä- und postsynaptischen Proteinen die Funktion, Spezifikation und Plastizität von Synapsen (Südhof, 2008b).

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die Proteinexpression von Neuroligin-2, Neuroligin-3 sowie Neurexin-1 zum Zeitpunkt P28 und 3 Monate fehlreguliert zu sein scheint. Genauer gesagt ergaben massenspektrometrische Analysen eine signifikante Überexpression der drei Proteine in kortikalen Synaptosomen heterozygoter *Tsc2*-Mäuse zu beiden Zeitpunkten, was im Rahmen von Western Blot Analysen kortikaler Homogenate und Synaptosomen bestätigt werden konnte. Da in unserem verwendeten Mausmodell keine genetische Mutation in einem der Neuroligin- oder Neurexin-Gene vorliegt, liegt die Vermutung nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Dysregulationen des Neuroligin/Neurexin-Systems als mal-adaptive Konsequenz der kompensatorischen Prozesse zu verstehen sind, die aus dem primären Defekt der *Tsc2* Mutation und der damit einhergehenden frühen Anomalien in der postsynaptischen Proteinexpression resultieren (zuvor diskutiert). Die Beobachtung, dass zwei der drei wichtigen und ASS-assoziierten Neuroligine sowie Neurexin-1 in kortikalen Fraktionen dysreguliert sind, während kein Expressionsunterschied in hippocampalen Fraktionen erkennbar ist, deutet auf ein komplexes und hirnregionenspezifisches System der Neuroligin/Neurexin-Beeinträchtigung hin, welches einerseits die Entwicklung der autistischen Verhaltensauffälligkeiten fördern und andererseits zusätzlich zu einer Störung des E/I-Gleichgewichts führen kann.

Die Auswirkungen einer Neuroligin/Neurexin-Dysregulation auf die synaptische Funktion und das Verhalten ist bereits aus verschiedensten Studien bekannt. Versuche an Mäusen konnten eine Störung der E/I-Balance durch einen Funktionsverlust bestimmter Neuroligine nachweisen (Chih et al., 2005; Levinson & El-Husseini, 2005). Beispielsweise erhöht eine Überexpression von Neuroligin-1 das E/I-Gleichgewicht (Dahlhaus et al., 2010), während eine Überexpression von Neuroligin-2 das Gegenteil bewirkt (Hu et al., 2015). Erhöhte Konzentrationen von Neuroligin-1 und -2 verschieben in einem Mausmodell für Phenylketonurie das E/I-Gleichgewicht in Richtung Hemmung (de Jaco et al., 2017). Einige Veröffentlichungen diskutierten bereits den Effekt einer gestörten E-/I-Balance auf die Entstehung von ASS (reviewed in (Dickinson et al., 2016)). So konnte bereits auch im *Tsc2*-Mausmodell gezeigt werden, dass das Gleichgewicht in Richtung Erregung verschoben und die E/I-Balance dadurch gestört wird (Bateup et al., 2013; Tavazoie et al., 2005a). Zusätzlich zu dem Einfluss des Neuroligin/Neurexin-Systems auf die E/I-Balance deuten mehrere Studien auf eine Rolle der Neuroligine bei der Bildung synaptischer Kontakte und deren Reifung hin (Chih et al., 2005; Chubykin et al., 2005; Dean et al., 2003; Graf et al., 2004; Levinson et al., 2005; Varoqueaux et al., 2006). Weitere Studien bestätigten den Einfluss von Neuroliginen auf intrinsische synaptische Funktionen, wie beispielsweise die Regulation der synaptischen Konzentration von NMDA- und AMPA-Rezeptoren (Cao & Tabuchi, 2017; Chanda et al., 2015; Südhof, 2008b). Die verhaltensbezogenen und physiologischen Auswirkungen in Neuroligin-/Neurexin-Mausmodellen sind stark davon abhängig, in welchem Molekül ein Defekt vorliegt und welches Hirnareal davon betroffen ist (Etherton et al., 2011; Jedlicka et al., 2015; Tabuchi et al., 2007). Beispielsweise ist publiziert, dass die Überexpression von Neuroligin-2 in transgenen Mäusen verschiedene Verhaltensdefizite wie auch repetitives Verhalten, erhöhte Ängstlichkeit und eine beeinträchtigte soziale Interaktionsfähigkeit aufweisen (Hines et al., 2008).

Während der Gehirnentwicklung nimmt die Expression der Neuroligine 1-4 zwischen den embryonalen und späteren postnatalen Tagen zu, bevor sie in bestimmten Hirnregionen der Maus nach etwa drei Wochen ein Plateau erreicht (Jamain et al., 2008). Diese Studie deutet darauf hin, dass auch für die Neuroligine ein genaues und kritisches Entwicklungsfenster besteht und diese Proteine damit bestimmende Faktoren innerhalb kritischer Entwicklungszeiträume im Gehirn sind, und eine Dysregulation letztlich in Verhaltensstörungen wie Intelligenzminderung oder ASS resultieren kann (Südhof, 2008b).

Zusammenfassend deuten die Daten der vorliegenden Studie auf frühe postnatale homöostatische Anpassungs- und Fehlanpassungsprozesse in kortikalen Fraktionen von *Tsc2*^{+/-}-Tieren hin, welche parallel zur Entwicklung des Verhaltensphänotyps zu einer Dysregulation des Neuroligin/Neurexin-Systems führen und dadurch einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese von ASS in unserem untersuchten *Tsc2*-

Mausmodell zu haben scheinen. Dies eröffnet ein vulnerables Fenster für therapeutische Möglichkeiten in jungen Tieren zwischen der Geburt und dem Zeitpunkt P17 – also zu der Zeit, in der die *Tsc2*-Proteinexpression noch vermindert, die Neuroligin/Neurexin-Spiegel noch unbeeinträchtigt und der autistische Phänotyp noch nicht präsent ist.

4.3 Molekulare Grundlagen der Konsolidierungsdefekte in heterozygoten *Tsc2*-Mäusen

4.3.1 Kein Hinweis auf Projektionsdefizite oder Neurodegeneration im Hippocampus alternder *Tsc2*^{+/-}-Mäuse

Die Ergebnisse der vorangegangenen phänotypischen Längsschnittanalyse ließen vermuten, dass die altersabhängige Entwicklung der kognitiven Beeinträchtigung auf einen degenerativen Prozess in alternden *Tsc2*^{+/-} Mutanten zurückzuführen sein könnte, welcher einerseits zum Zelltod und reduzierten Zellzahlen und andererseits zur Degeneration von Projektionen innerhalb der Gedächtnisschaltung führen könnte. Weiterhin deuteten die Ergebnisse der vorangegangenen IEG Expressionsstudie durch unter anderem auf einen hippocampalen Defekt hin. In der vorliegenden Studie wurden zunächst die Projektionen zwischen dem Hippocampus und dem entorhinalen Kortex – dem so genannten Tractus perforans – in Hinblick auf degenerative Prozesse mittels neuroanatomischem Tracing untersucht.

Bei der Durchführung der Experimente und der Validierung der Injektionsstellen ist aufgefallen, dass die Injektionsstellen des entorhinalen Cortex nicht zufriedenstellend waren und aus diesem Grund diese Injektionen von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Das hat vor allem technische Gründe bzw. ist auf methodische Grenzen zurückzuführen. Der entorhinale Cortex ist ein sehr kleines, nicht abgegrenztes Hirnareal und stellt im murinen Gehirn eine der tiefst-gelegenen Hirnregionen dar, wodurch es sehr schwierig ist, diese Region präzise zu treffen. Damit einhergehend stellt ein weiteres Problem die Bestimmung der Koordinaten für die spezifischen Hirnregionen anhand des Hirnatlas „The mouse brain in stereotactic Coordinates“ dar. Zur Erstellung dieses Hirnatlas wurden Gehirne innerhalb eines Gewichtsbereiches gewählt, der für eine ausgewachsene Maus repräsentativ ist. Allerdings wird kein genaues Alter der verwendeten Mäuse genannt. Da wir für das vorliegende Experiment ausschließlich Mäuse im Alter von 8-10 Monaten verwendet haben ist davon auszugehen, dass die Hirne nochmals geringfügig größer beziehungsweise kalzifizierter sein können, wodurch es zu Abweichungen zwischen den gewählten berechneten Koordinaten und der eigentlichen Injektionsstelle kommen konnte. Zusätzlich dazu wäre es sinnvoll, bei derart tiefen Hirnregionen nicht mehr mit Glaskapillaren als Injektionsinstrument zu arbeiten, da diese sehr empfindlich sind und leicht brechen können, wenn sie auf Kalzifizierungen oder

Knochen stoßen. Hier würde sich die Mikroinjektion mittels Hamilton-Injektionsspritze anbieten, welche nicht nur robuster, sondern gleichzeitig auch dünner ist und dadurch eine sehr viel präzisere Injektion gewährleistet werden kann, was letztlich die Variabilität der Ergebnisse deutlich verringern würde. Aufgrund des Ausschlusses der entorhinalen Injektionsstelle war es leider nicht möglich, die Projektionen des Tractus perforans vollständig zu untersuchen. Da der entorhinale Cortex als Knotenpunkt zwischen dem Hippocampus und dem kortikalen Netzwerk eine bedeutende Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung und dem Abruf von Erinnerungen einnimmt, wäre es notwendig, diese Nervenfaserbahnen und deren Projektionen auf Defekte oder Anomalien zu untersuchen, um diese als Ursache für die kognitiven Defizite mit Sicherheit und vollständig ausschließen zu können. Bei einer Wiederholung dieses Versuchs sollten dann nicht nur die Anpassung der Koordinaten und die Wahl der Injektionsspritze, sondern auch die Wahl des konjugierten Alexa-Farbstoffs überdacht werden. Im durchgeführten Experiment wurde diese Stelle mit dem Infrarot-gekoppeltem CTB injiziert, wodurch eine Visualisierung nur mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops, nicht aber mittels Elektronenmikroskopie möglich ist. Dies erschwert die Suche und Identifikation möglicher Projektionen sehr, da ein schnelles Durchscannen jedes einzelnen Gehirns mittels konfokalem Mikroskop technisch und zeitlich nicht möglich ist und das damit einhergehende Ausbleichen der Fluoreszenz zu stark wäre. Es wäre sinnvoll, im Rahmen dieses Experiments eine genauere und sorgfältigere Testreihe in einer größeren Testkohorte alternder Tiere durchzuführen, um alle genannten Parameter zu berücksichtigen, die passendsten Konditionen zu ermitteln und vorab alle Hirnregionen mit möglichen Projektionen zu identifizieren. Aus methodischer Sicht wäre es eleganter, bei einer Wiederholung des Experiments ganz und gar auf die so genannte „Tissue-Clearing“ Methode zu setzen, welche den optischen Zugang zu intaktem Gewebe auf subzellulärer Ebene in 3D ermöglicht. Dabei wird das Gewebe durch Minimierung der Lichtstreuung und -absorption transparent gemacht und ermöglicht so die Tiefenbildgebung von großvolumigen Proben, wodurch umfassende Informationen über intakte biologische Systeme auf Zeit- und Kosten-effiziente Weise generiert werden können.

Dennoch konnte die Analyse des Hippocampus selbst einige wichtige Erkenntnisse im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift liefern. Bei der Untersuchung der Hippocampus-Anatomie konnte anhand der Bestimmung der Zellzahl und der Flächengröße des Gyrus Dentatus sowie des Cornu Ammonis 3 kein signifikanter Unterschied zwischen alternden *Tsc2^{+/-}*-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren detektiert werden, womit eine hippocampale Neurodegeneration als zugrundeliegende Ursache für die kognitiven Defizite ausgeschlossen werden kann. Wichtig wäre hier, auch noch den Bereich des Cornu Ammonis 1 und 2 zu untersuchen, um den Hippocampus vollständig abzudecken – dies war technisch leider nicht möglich, da dieser Bereich auf den

konfokalen Aufnahmen nicht vollständig abgebildet war. Hier müsste mit einer anderen Vergrößerung und anderen Ausschnitten gearbeitet werden. Die Untersuchung der Projektionen vom dorsalen in den ventralen bzw. vom ventralen in den dorsalen Hippocampus hat ebenfalls keine signifikanten Abweichungen zwischen *Tsc2*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp Kontrolltieren gezeigt, womit hippocampale Projektionsdefizite ausgeschlossen werden können. Dieses Ergebnis wird durch weitere neuroanatomische Experimente, durchgeführt von [Name] im Rahmen einer Kollaboration mit dem Institut für mikroskopische Neuroanatomie unter der Leitung von [Name] in Mainz, unterstützt. Im Rahmen dieser Kollaboration wurde eine Kreuzung der *Tsc2*-Mauslinie mit Mäusen der Linie Thy1-GFP erzeugt. Diese transgenen Mäuse zeichnen sich durch eine starke zytosolische eGFP Expression in vereinzelt Nervenzellen, insbesondere der neokortikalen Schicht V und hippocampalen CA1 Region aus (G. Feng et al., 2000). Eine Kreuzung der beiden Mauslinien ermöglicht die Untersuchung der synaptischen Morphologie und Anatomie in verschiedenen Hirnarealen heterozygoter *Tsc2*^{+/-}-Tieren durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren. [Name] konnte zeigen, dass keine morphologischen Anomalien, gemessen anhand der Anzahl und Größe neuronaler Dendriten im Hippocampus, in 9 Monate alten Thy1-*Tsc2*^{+/-}-Tieren vergleichend mit wildtypischen Geschwistertieren zu erkennen sind (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnte er mittels Immunhistochemie zeigen, dass kein Unterschied in der Dichte exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen innerhalb des Hippocampus (Gyrus Dentatus, Cornu Ammonis 1 und 3) vorliegt. Zusammenfassend kann somit ein neurodegenerativer und morphologischer Defekt als zugrundeliegende Ursache für den kognitiven Phänotypen alternder *Tsc2*^{+/-}-Tiere ausgeschlossen werden.

4.3.2 Proteomische Analysen in Hippocampi alternder *Tsc2*^{+/-}-Tiere

Um zu untersuchen, ob als Ursache der kognitiven Defizite das Proteom hippocampaler Neurone von *Tsc2*^{+/-}-Tieren gegenüber wildtypischen Kontrollen verändert vorliegt, wurden Hippocampi 8-10 Monate alter Tiere hinsichtlich differentiell exprimierter Proteine massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde vor allem in den synaptosomalen Fraktionen eine erhebliche Herunterregulation synaptischer Membranproteine rund um den NMDA-Rezeptor GluN2A und verschiedener Aktin-Zytoskelett-assoziiierter Proteine festgestellt, darunter auch β -Aktin selbst. Dieses Ergebnis konnte mittels Western-Blot Analysen nicht validiert werden – hier waren weder im Homogenat noch in den Synaptosomen signifikante Unterschiede in der Proteinexpression des NMDA-Rezeptors GluN2A sowie β -Aktin erkennbar. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Unterschiede durch die weniger sensitive Methode des Western Blottings nicht detektiert werden können. Da mit GluN2A und β -Aktin nur ein kleiner Teil der durch die Massenspektrometrie detektierten differenziell exprimierten Proteine mittels Western Blot untersucht wurden, wäre es sinnvoll und

interessant, noch weitere dieser Proteine aus der Kategorie der synaptischen Membranproteine oder des Aktin-Zytoskeletts zu untersuchen bzw. zu validieren. Weiterhin könnte die Massenspektrometrie nochmals durch weitere technische Replikate wiederholt werden, um methodische Fehler und Artefakte auch von dieser Seite auszuschließen. Interessanterweise konnte innerhalb der Western-Blot Analysen auch in hippocampalen Fraktionen alternder Tiere kein Unterschied in der Expression und Phosphorylierung der mTOR-Zielproteine phospho-S6 und phospho-Akt gezeigt werden, was, wie schon in Kapitel 4.2.1 diskutiert, kontrovers zu vorherigen publizierten Studien ist und womöglich durch methodische Grenzen des Western Blottings, vor allem im Nachweis phosphorylierter Proteine, zurückzuführen sein kann. Auch hier wäre die Überlegung sinnvoll, andere bzw. sensitivere Methoden zu verwenden sowie die Proteinexpression weiterer Zielproteine und auch von mTOR selbst zu untersuchen.

Besonders das Ergebnis des differentiell exprimierten β -Aktins war von großem Interesse, nachdem bereits mehrere Studien, unter anderem eine Publikation von Huang et al. (W. Huang et al., 2013), einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Aktin-Polymerisation und Defekten in der Gedächtniskonsolidierung nachweisen konnten. Nach Fraktionierung von β -Aktin in globuläres und filamentöses Aktin konnte jedoch kein Unterschied zwischen $Tsc2^{+/-}$ -Tieren gegenüber wildtypischen Geschwistertieren festgestellt werden. Das Protokoll folgte hierbei der Studie von Huang et al., wobei in der vorliegenden Studie anstelle der traditionellen Western Blot Methode eine sensitivere, kapillarbasierte Western Blot Methode verwendet wurde, um möglichst verlässlich auch geringe Unterschiede in der Aktin-Polymerisierung feststellen zu können. Anzumerken ist, dass die Massenspektrometrie eine differentielle Expression von β -Aktin nur in der synaptosomalen Fraktion nachweisen konnte. Bei der Fraktionierung des Hippocampus in lösliche und unlösliche Kompartimente zur Trennung von globulärem und filamentösem Aktin konnte allerdings aufgrund des zu geringen Materials und unvereinbarer Protokolle keine separate Fraktionierung von Homogenaten und Synaptosomen erfolgen. Somit ist fraglich, ob ein Defekt in der Aktin-Polymerisation in den Synaptosomen über eine Analyse des Gesamt-Homogenats überhaupt detektierbar wäre. Zusätzlich zur *in vitro* Analyse wurde in diesem Zusammenhang jedoch auch eine *in vivo* Analyse durchgeführt, wonach nach stereotaktischer Injektion mit Jasplakinolide – ein Wirkstoff, welcher direkt die Polymerisation und Stabilisierung von Aktin Filamenten fördert (W. Huang et al., 2013) – keine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung von alternden heterozygoten $Tsc2$ -Tieren erzeugt werden konnte. Somit konnte eine gestörte Aktin-Polymerisation als zugrundeliegende Ursache für den Konsolidierungsdefekt alternder $Tsc2^{+/-}$ -Tiere ausgeschlossen werden.

4.3.3 IGF-II gleicht den Konsolidierungsdefekt in alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen aus

Einige Studien der letzten Jahrzehnte konnten bereits die Rolle von IGF-II in der Gedächtnisbildung herausarbeiten. 2011 konnten Chen et al. zeigen, dass Injektionen von rekombinantem IGF-II in den Hippocampus während der kritischen Phase der Gedächtniskonsolidierung die Gedächtnisleistung erheblich verbessern und das Vergessen von Gedächtnisinhalten verhindern konnte. Steinmetz et al. konnten nachweisen, dass in einem BTBR-Mausmodell für ASS der mTOR-Signalweg dysreguliert zu sein scheint, und dass diese Dysregulation durch eine systemische Verabreichung von IGF-II aufgehoben werden kann (Steinmetz et al., 2018b). Weiterhin zeigten sie, dass BTBR-Mäuse eine mTOR-vermittelte überhöhte aktive Translation aufweisen, die durch IGF-II über den IGF-II-Rezeptor reduziert wird.

Analog zu dieser Studie sollte der Effekt von IGF-II auf die Gedächtnisleistung alternder *Tsc2*^{+/-}-Tiere untersucht werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Studien wurde erwartet, dass eine hippocampale Injektion von IGF-II möglicherweise die Gedächtnisleistung alternder heterozygoter *Tsc2*-Tiere verbessern könnte. Unter Verwendung gleicher methodischer Bedingungen konnte diese Hypothese bestätigt werden: die alternden *Tsc2*^{+/-}-Tiere zeigten nach bilateraler Injektion von rekombinantem IGF-II in den dorsalen Hippocampus eine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Als Vergleich dazu durchliefen die Tiere vor der eigentlichen Test-Versuchsreihe eine Trainings-Batterie ohne IGF-II-Injektion, mit welcher bestätigt wurde, dass die verwendeten Tiere den bereits bekannten kognitiven Phänotypen aufzeigen. Unter Verwendung anderer Objekte zeigten die *Tsc2*^{+/-}-Tiere hier eine gestörte Gedächtnisleistung innerhalb des 7d NORT im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren. Somit wurde bewiesen, dass die alternden *Tsc2*^{+/-}-Tiere vor IGF-II Injektion den kognitiven Phänotyp aufzeigen, während dieser nach IGF-II-Injektion ausgeglichen werden konnte. Wie bei der zuvor nachgewiesenen Wirkung von IGF-II als Gedächtnisverstärker konnte gezeigt werden, dass der Effekt von IGF-II auch innerhalb des TS-Mausmodells Wirkung zeigt und in der Lage ist, die kognitiven Anomalien abzuschwächen bzw. aufzuheben. Dies könnte in Folgestudien auch noch im Rahmen der episodischen Gedächtnisbatterie untersucht werden, da bei der Bildung episodischer Gedächtnisinhalte nochmals andere neurologische Pfade und Hirnareale beansprucht werden. So wäre es interessant, den Effekt von IGF-II auf das episodische Gedächtnis unter Berücksichtigung kortikaler Strukturen wie dem präfrontalen oder dem entorhinalen Kortex zu analysieren. Dabei sollte bedacht werden, dass das Protokoll der Injektionen eventuell zeitlich angepasst werden müsste. Bei einer Versuchsreihe wie der episodischen Gedächtnisbatterie, die sich über einen Zeitraum von 5 Wochen erstreckt, ist eine einmalige Injektion von IGF-II womöglich nicht ausreichend – bislang sind keine Informationen darüber bekannt, wie lange der Effekt des rekombinanten IGF-II nach Injektion stabil bleibt. Besser wäre es,

hier mit osmotischen Minipumpen oder einem IGF-II-kodierenden Adeno-assoziierten Virus zu arbeiten, um eine gezielte beziehungsweise langanhaltende IGF-II Verfügbarkeit zu gewährleisten und das Leiden der Tiere möglichst gering zu halten. Zusätzlich dazu konnten vorherige Studien, wie auch die bereits aufgeführte von Steinmetz et al., nicht nur einen positiven Effekt von IGF-II auf die Kognition, sondern auch auf Autismus-ähnliche Verhaltensmuster zeigen. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, die Versuchsreihe zusätzlich auch in jüngeren Mäusen durchzuführen, um den Effekt von IGF-II auf das repetitive Verhalten, die soziale Interaktion und den Nestbau zu untersuchen.

Auch wenn wir nachweisen konnten, dass IGF-II den kognitiven Phänotyp in alternden *Tsc2^{+/-}*-Mäusen verbessern kann, so wurde der Mechanismus dahinter noch nicht weiter untersucht. Unsere vorhergehenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die *Tsc2*-Proteinexpression in alternden Tieren nicht verändert vorliegt, weswegen wir davon ausgehen, dass kompensatorische Mechanismen den Effekt der primären Heterozygotie ausgleichen können. Zusätzlich dazu konnten wir mittels Western Blot Analyse keine signifikanten Unterschiede in der Expression und Phosphorylierung der mTOR-Zielproteine phospho-S6 und phospho-Akt erkennen, weswegen wir nicht zwangsläufig von einer Überaktivität der mTOR-Kinase sprechen können. Dies ist allerdings widersprüchlich zu bereits publizierten Studien unter Verwendung des TS-Mausmodells. Um zu untersuchen, ob dennoch eine erhöhte Proteintranslationen in verschiedenen Hirnregionen heterozygoter *Tsc2*-Tiere vorliegen könnte, welche dann durch IGF-II-Zugabe normalreguliert wird, bedarf es einer sensitiveren und quantitativeren Methode, beispielsweise mittels eines Proteinsynthese-Assays, bei dem der Einbau von Puromycin in neu synthetisierte Proteine nach Injektion in jeweilige Hirnregionen gemessen werden kann. Auch eine massenspektrometrische Analyse der proteomischen Komposition, sowohl unabhängig von IGF-II als auch nach IGF-II-Injektion, wäre sinnvoll, da dies gegenüber dem Western Blotting eine sehr viel sensitivere Methode darstellt. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, die Rolle des IGF-II Rezeptors im TS-Mausmodell näher zu beleuchten. Der CIM6P/ IGF-II-Rezeptor ist nachweislich für die Regulation des endosomalen Proteinverkehrs sowie die lysosomale Ausrichtung verantwortlich und konnte in mehreren Studien als Schlüsselprotein für die IGF-II vermittelte Gedächtnisverbesserung identifiziert werden (Cruz et al., 2021; DY et al., 2011; Steinmetz et al., 2018a; Stern, Chen, et al., 2014). Folgestudien sollten daher den Fokus darauflegen, nicht nur die Proteintranslation von mTOR, mTOR-Zielproteinen und endogenem IGF-II, sondern auch des endogenen IGF-II-Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen unter Verwendung verschiedener Methoden im TS-Mausmodell zu untersuchen.

Die Studie von Steinmetz et al. stellt eine für die vorliegende Dissertationsschrift sehr interessante Studie dar, da sie zusätzlich zu der Wirkung von IGF-II auf das Verhalten

autistischer Mäuse und der Identifikation des IGF-II-Rezeptors als Schlüsselprotein auch versuchten, die molekularen bzw. zellulären Zusammenhänge dahinter aufzuschlüsseln. Interessant ist demnach die Erkenntnis, dass die Umkehrung der überaktiven Proteintranslation durch IGF-II/ IGF-II-R aus einem wiederhergestellten Gleichgewicht der synaptischen Homöostase durch Autophagie, lysosomalem Abbau und Proteintranslation resultiert. Da dies aber unabhängig von IGF-I/IGF-IR passiert (Steinmetz et al., 2018a) wird vermutet, dass IGF-II über IGF-II-R durch eine Verringerung der Proteintranslation und/oder eine Erhöhung des Proteinabbaus eine einzigartige Wirkung auf die neuronale Plastizität hat, welche sich von der des IGF-I-Systems unterscheidet. Dies ist konkordant mit der Hypothese, dass es in unserem TS-Mausmodell schon früh zu einer Störung der neuronalen Homöostase kommt, welche womöglich über die komplette Lebensspanne hinweg besteht, zur Ausprägung der Verhaltensauffälligkeiten führen und durch IGF-II Injektion normalreguliert werden könnte.

4.3.4 IGF-II normalisiert die mRNA-Expression des unmittelbar frühen Gens *c-fos* im Hippocampus von alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen

Unmittelbar frühe Gene (IEGs) sind Frühreaktionsgene, die als Reaktion auf neuronale Aktivität koordiniert aktiviert und dynamisch reguliert werden. Sie gelten demnach als zelluläre Marker für neuronale Plastizität. Viele Studien postulierten, dass die Expression von IEGs wie *c-fos* oder *zif268* in bestimmten Hirnregionen während neuronaler Aktivität im Zusammenhang mit Verhaltensaufgaben induziert werden. IEGs werden in bestimmten neuronalen Ensembles induziert, die mit der Kodierung neuer Informationen in Verbindung stehen, und die Expression ist für die Konsolidierung dieser Informationen unerlässlich.

Vorangegangene Studien unseres Instituts konnten zeigen, dass die IEGs *c-fos* und *zif268* im Kontext der Gedächtniskonsolidierung eine verminderte mRNA-Expression in verschiedenen Hirnregionen – vor allem aber im Hippocampus – heterozygoter *Tsc2*-Mäuse zeigten. Dies führte zu der Annahme, dass ein Defekt in Konsolidierungsassoziierten Hirnregionen heterozygoter *Tsc2*-Tiere vorzuliegen scheint. In der vorliegenden Dissertationsschrift konnten wir zeigen, dass hippocampale Injektionen von rekombinantem IGF-II den Konsolidierungsdefekt in heterozygoten *Tsc2*-Tieren verbessern konnten. Darüber hinaus sollte der Effekt von IGF-II auf die Expression der IEGs *c-fos* und *zif268* untersucht werden. Erst kürzlich wurde in einer Studie von Yu et al. der Effekt von IGF-II bzw. des IGF-II-Rezeptors nicht nur auf die Gedächtniskonsolidierung selbst, sondern auch auf die Training-induzierte Hochregulation von IEG-Proteinen nachgewiesen (Yu et al., 2020b). Wir konnten zeigen, dass eine Injektion von rekombinantem IGF-II während der Trainingsphase des 7d NORT die mRNA-Expression des IEGs *c-fos* nach der Testphase wieder auf Wildtyp-Niveau

zurückbringen konnte. Während in der Kontrollgruppe eine signifikante Erniedrigung der *c-fos* mRNA-Expression in den *Tsc2^{+/-}*-Tieren vergleichend zu wildtypischen Geschwistertieren gezeigt werden konnte – wodurch die Ergebnisse der vorangegangenen Studie bestätigt werden konnten – so konnte nach IGF-II-Injektion kein signifikanter Unterschied mehr verzeichnet werden. Die Expression von *c-fos* war demnach in den heterozygoten *Tsc2*-Tieren nach IGF-II-Injektion signifikant erhöht im Vergleich zur Expression in heterozygoten Tieren der PBS-behandelten Kohorte. Im Vergleich dazu konnte für das IEG *zif268* weder in der Kontroll-Kohorte noch in der IGF-II-behandelten Gruppe ein Unterschied in der mRNA Expression festgestellt werden. Das unterschiedliche Expressionsmuster von *c-fos* und *zif268* könnte dadurch erklärt werden, dass die Expression verschiedener IEGs nicht nach demselben Schema ablaufen. *C-fos* und *zif268* unterliegen unterschiedlichen biochemischen Prozessen und können demnach auch unterschiedliche Funktionen haben (Bisler et al., 2002; Davis et al., 2003). Während *c-fos* vor allem durch die Exposition neuer Reize stimuliert wird, steht die Expression von *zif268* eher im Zusammenhang mit einer länger anhaltenden synaptischen Stimulation (Chaudhuri et al., 2000). In diesem Zusammenhang könnten in Folgestudien sowohl weitere IEGs anderer Signalkaskaden sowie auch andere Hirnregionen untersucht werden, um ein vollständiges Bild über die Beteiligung bzw. die Defekte verschiedener Hirnareale bei der Gedächtniskonsolidierung zu erhalten.

Interessanter Weise konnten Yu et al. innerhalb ihrer Studie zwar einen Effekt des IGF-II-Rezeptors auf die Trainings-induzierte Hochregulation von IEG-Proteinen, nicht aber auf die Expression der korrespondierenden mRNAs nachweisen. Dies steht im Kontrast zu unseren Daten, da die IEG-Expressionsanalysen in der vorliegenden Studie ausschließlich auf Transkriptions-, nicht aber auf Translationsebene durchgeführt wurden. Inwieweit die Studie von Yu et al. mit der vorliegenden vergleichbar ist, muss diskutiert werden. Ein großer Unterschied der beiden Studien ist die Auswahl des Tiermodells; während die Untersuchungen bezüglich der IEGs von Yu et al. nur an Ratten durchgeführt wurden, wurden innerhalb der vorliegenden Dissertationsschrift ausschließlich Mäuse verwendet. Obwohl die Gehirne von Ratte und Maus anatomisch weitestgehend homolog sind, wurden mehrere wichtige funktionelle Unterschiede beschrieben (zusammengefasst in Ellenbroek & Youn, 2016). So zeigten Studien erhebliche Unterschiede in der neuronalen Plastizität zwischen Ratten und Mäusen auf, die sich nicht nur auf den Hippocampus beschränkten, sondern auch auf die kortikalen Regionen übergreifen (Snyder et al., 2009). Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit kein Defekt des IGF-II-Rezeptors untersucht. In der Studie von Yu et al. wurde die Trainings-induzierte Hochregulation von IEG-Proteinen durch die Kontrolle des IGF-II-Rezeptors und nicht durch IGF-II selbst nachgewiesen, weswegen nicht eindeutig geschlussfolgert werden kann, dass die beiden betroffenen Signalkaskaden vergleichbar sind. In weiteren Untersuchungen sollte der molekulare Wirkmechanismus einer IGF-II-

Zugabe auf die Expression von IEGs im Hippocampus von *Tsc2*-Mäusen weiter untersucht wären. Es wäre interessant, die Expression der IEGs auch auf Proteinebene zu bestimmen, um nachzuweisen, ob der Effekt nur auf Transkriptions- oder auch auf Translationsebene stattfindet. Zusätzlich dazu könnte auch in Bezug auf die IEGs die Rolle des IGF-II-Rezeptors untersucht werden, um herauszufinden, ob der Effekt Liganden-abhängig oder Rezeptor-abhängig ist.

Weiterhin wäre es notwendig zu untersuchen, ob die Fehlregulation der IEGs im TS-Mausmodell sowie auch die Wiederherstellung der *c-fos*-Expression auf Normalniveau durch IGF-II mTOR abhängig ist. Vorerst müsste, wie auch schon in vorherigen Kapiteln diskutiert, genauer untersucht werden, inwieweit im Hippocampus alternder Mäuse eine mTOR-Hyperaktivität vorliegt, und ob diese als Ursache für eine fehlerhafte IEG-Expression in Frage käme. Bislang konnten nur wenige Studien den Effekt von mTOR auf die Expression von IEGs nachweisen. Beispielsweise ist bekannt, dass die Transkription von IEGs über die Aktivierung des Erk/MAPK-Signalwegs erfolgt, welche dem mTOR-Signalweg vorangeschaltet ist. Beispielsweise konnte eine Inhibierung des MAPK-Signalwegs eine dramatische Abschwächung der Induktion von IEGs hervorrufen (Tyssowski et al., 2018). Einige Studien konnten anhand der Hemmung des mTOR-Signalwegs eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs aufzeigen, was eine mTOR-MAPK Rückkopplungsschleife vermuten lässt (Carracedo et al., 2008b). Eine Dysregulation von mTOR könnte demnach indirekt Einfluss auf die Regulation der Expression verschiedener IEGs über den MAPK-Signalweg ausüben. Eine bislang nicht publizierte Studie unseres Instituts, durchgeführt von Martin Schüle, konnte zeigen, dass eine Inhibition von mTOR *in vitro* zu einer erhöhten Expression einiger IEGs, unter anderem auch *c-fos*, sowohl auf Transkriptions- als auch Translationsebene führt. Dies war zwar teilweise, jedoch nicht ausschließlich abhängig von dem MAP-Kinase-Signalweg. Dadurch kann vermutet werden, dass mTOR, nicht nur allein über den MAPK-Signalweg, Einfluss auf die Expression von IEGs haben kann. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden, auch *in vivo*. Angenommen, dass mTOR die Expression von IEGs reguliert, und eine Dysregulation von mTOR in einer Fehlregulation von IEGs resultieren könnte, so wäre wiederum der Einfluss von IGF-II auf die Expression von IEGs über mTOR denkbar. Kontrovers ist allerdings, dass IGF-II als Wachstumsfaktor den mTOR-Signalweg aktiviert, und eine zusätzliche mTOR-Aktivierung in einem TS-Mausmodell mit vermuteter hyperaktiver mTOR-Kinase zu einer noch höheren Aktivität führen würde. Unter der Vermutung, dass womöglich ein Defekt oder eine Verminderung der IGF-II-Rezeptoren vorliegt – was möglicherweise auch einen negativen Einfluss auf die mTOR-Aktivität haben könnte – würde andererseits, wie auch in der Studie von Steinmetz et al., eine Zugabe von IGF-II sinnvoll sein. Weiterhin könnte ein Effekt von IGF-II auf die Proteintranslation bzw.

Proteindegradierung unabhängig des mTOR-Signalwegs vermutet bzw. untersucht werden.

4.4 Fazit

Unter Verwendung eines konstitutiven, heterozygoten *Tsc2*-Mausmodells konnten wir in der vorliegenden Arbeit anhand einer phänotypischen Längsschnittanalyse das Verhalten der Tiere longitudinal charakterisieren und mit den molekularen Signaturen während der gesamten Gehirnentwicklung abgleichen. Wir konnten zeigen, dass das Tsc2 Protein nur in sehr frühen Stadien, embryonal und postnatal, reduziert vorliegt und zu späteren Zeitpunkten, wenn Verhaltensauffälligkeiten auftreten, kompensiert zu sein scheint, woraus wir schließen, dass sich der Phänotyp unabhängig vom primären Gendefekt entwickelt. Darüber hinaus konnten wir als Ursache für die Entwicklung autistischer Verhaltensauffälligkeiten – welche zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat auftreten – eine substantielle homöostatische Dynamik der Expression synaptischer Rezeptormoleküle in sehr frühen postnatalen Stadien identifizieren, welche als maladaptive Konsequenz in einem Fenster der Neuroligin-/Neurexin-Fehlexpression in kortikalem Gewebe zum Zeitpunkt der Verhaltensauffälligkeiten resultiert. Hinsichtlich der Entstehung der kognitiven Defizite konnten sowohl zelldegenerative Prozesse als auch Projektionsdefizite ausgeschlossen werden. Zusätzlich dazu konnte der Verdacht auf einen Aktin-Polymerisationsdefekt als zugrundeliegende Ursache nicht bestätigt werden. Vielmehr werden auch hier die Konsequenzen der frühen homöostatischen und womöglich auch über die gesamte Lebensspanne hinweg bestehenden Fehlregulation als ursächlich vermutet. Eine Behandlung mit dem Gedächtnis-verbessernden Wachstumsfaktor IGF-II konnte sowohl den kognitiven Phänotypen in alternden *Tsc2*^{+/-}-Mäusen verbessern als auch die Trainings-induzierte Reduktion des unmittelbar frühen Gens *c-fos* im Hippocampus wieder normalisieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit die molekularen Mechanismen einer mTOR Dysregulation in Zusammenhang mit Autismus und Intelligenzminderung weiter aufklären konnte und dadurch neue Möglichkeiten zur Therapie von TS in vulnerablen Entwicklungsfenstern und womöglich auch anderer, mit ähnlichen Symptomen assoziierte monogene Erkrankungen, eröffnet hat. Besonders vielversprechend scheint ein therapeutischer Ansatz während eines frühen vulnerablen Fensters zu sein, währenddessen die Tsc2-Proteinexpression noch reduziert vorliegt und erste dynamische homöostatische Prozesse angestoßen werden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass eine exogene Stimulation zu frühen Zeitpunkten die Tsc2-Expression durch das intakte Allel erhöht und eine spätere phänotypische Entwicklung abgeschwächt oder sogar vollständig vermieden werden könnte.

Literaturverzeichnis

- Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. v., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., Nelson, S. F., Cantor, R. M., & Geschwind, D. H. (2008). Linkage, Association, and Gene-Expression Analyses Identify CNTNAP2 as an Autism-Susceptibility Gene. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.005>
- Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 31, Issue 3, pp. 137–145). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005>
- Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). *Hippocampal neuroanatomy*. <https://psycnet.apa.org/record/2007-01023-003>
- Antoine, M. W., Langberg, T., Schnepel, P., & Feldman, D. E. (2019). Increased Excitation-Inhibition Ratio Stabilizes Synapse and Circuit Excitability in Four Autism Mouse Models. *Neuron*, 101(4), 648-661.e4. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.12.026>
- Arlt, A. (2019, April). *Molekulare Mechanismen der Gehirnfunktion bei mTOR-defizienten genetischen Syndromen mit kognitiven Störungen*. <https://openscience.ub.uni-mainz.de/handle/20.500.12030/4819>
- Aronica, E., & Crino, P. B. (2014). Epilepsy Related to Developmental Tumors and Malformations of Cortical Development. In *Neurotherapeutics* (Vol. 11, Issue 2, pp. 251–268). Springer Science and Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0251-0>
- Asano, E., Chugani, D. C., Muzik, O., Behen, M., Janisse, J., Rothermel, R., Mangner, T. J., Chakraborty, P. K., & Chugani, H. T. (2001). Autism in tuberous sclerosis complex is related to both cortical and subcortical dysfunction. *Neurology*, 57(7), 1269–1277. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.7.1269>
- Asato, M. R., & Hardan, A. Y. (2004). Neuropsychiatric problems in tuberous sclerosis complex. In *Journal of Child Neurology* (Vol. 19, Issue 4, pp. 241–249). BC Decker Inc. <https://doi.org/10.1177/088307380401900401>
- Au, K. S., Williams, A. T., Roach, E. S., Batchelor, L., Sparagana, S. P., Delgado, M. R., Wheless, J. W., Baumgartner, J. E., Roa, B. B., Wilson, C. M., Smith-Knuppel, T. K., Cheung, M. Y. C., Whittemore, V. H., King, T. M., & Northrup, H. (2007). Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. *Genetics in Medicine*, 9(2), 88–100. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31803068c7>

- Auerbach, B. D., Osterweil, E. K., & Bear, M. F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, *480*(7375), 63–68. <https://doi.org/10.1038/nature10658>
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P. F., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, *475*(7354), 91–96. <https://doi.org/10.1038/nature10130>
- Baig, D. N., Yanagawa, T., & Tabuchi, K. (2017). Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. *Brain Research Bulletin*, *129*, 82–90. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.10.006>
- Bailey, A. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, *121*(5), 889–905. <https://doi.org/10.1093/brain/121.5.889>
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, *75*(1), 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80085-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80085-6)
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., Ribeiro, A. M., & 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. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *0*(AUG), 112. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2013.00112>
- Basu, J., & Siegelbaum, S. A. (2015). The corticohippocampal circuit, synaptic plasticity, and memory. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 7, Issue 11, p. a021733). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021733>
- Bateup, H. S., Johnson, C. A., Deneffrio, C. L., Saulnier, J. L., Kornacker, K., & Sabatini, B. L. (2013). Excitatory/Inhibitory Synaptic Imbalance Leads to Hippocampal Hyperexcitability in Mouse Models of Tuberous Sclerosis. *Neuron*, *78*(3), 510–522. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.03.017>
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* *2002* *3:9*, *3*(9), 728–739. <https://doi.org/10.1038/nrn920>
- Berg, H. (1913). Vererbung der tuberösen sklerose durch zwei bzw. drei Generationen. *Zeitschrift Für Die Gesamte Neurologie Und Psychiatrie*, *19*(1), 528–539. <https://doi.org/10.1007/BF02909909>

- Betancur, C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. In *Brain Research* (Vol. 1380, pp. 42–77). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.078>
- Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J. H., Zilles, K., & 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. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 23(3), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(01\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(01)00155-7)
- Blazejczyk, M., Macias, M., Korostynski, M., Firkowska, M., Piechota, M., Skalecka, A., Tempes, A., Koscielny, A., Urbanska, M., Przewlocki, R., & Jaworski, J. (2017). *Kainic Acid Induces mTORC1-Dependent Expression of Elmo1 in Hippocampal Neurons*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9821-6>
- Bolton, P. F., & Griffiths, P. D. (1997). Association of tuberous sclerosis of temporal lobes with autism and atypical autism. *Lancet*, 349(9049), 392–395. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80012-8)
- Bolton, P. F., Park, R. J., Higgins, J. N. P., Griffiths, P. D., & Pickles, A. (2002). Neuro-epileptic determinants of autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Brain*, 125(6), 1247–1255. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWF124>
- Born, J., Rasch, B., & Gais, S. (2006). Sleep to remember. In *Neuroscientist* (Vol. 12, Issue 5, pp. 410–424). Sage Publications/Sage CA: Thousand Oaks, CA. <https://doi.org/10.1177/1073858406292647>
- Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 231–234). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.06.003>
- BOURNEVILLE, & DM. (1880). Sclerose tubereuse der circonvolutions cerebrales : Idiotie et epilepsie hemiplegique. *Arch Neurol*, 1, 81–91. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10024294554>
- Bozzi, Y., Provenzano, G., & Casarosa, S. (2018). Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. *European Journal of Neuroscience*, 47(6), 534–548. <https://doi.org/10.1111/EJN.13595>
- Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
- Brown, E. J., Beal, P. A., Keith, C. T., Chen, J., Shin, T. B., & Schreiber, S. L. (1995). Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. In *Nature* (Vol. 377,

- Issue 6548, pp. 441–446). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/377441a0>
- Bruni, O., Cortesi, F., Giannotti, F., & Curatolo, P. (1995). Sleep disorders in tuberous sclerosis: a polysomnographic study. *Brain and Development*, 17(1), 52–56.
[https://doi.org/10.1016/0387-7604\(94\)00118-H](https://doi.org/10.1016/0387-7604(94)00118-H)
- Bryzgalov, D. v., Kuznetsova, I. L., & Rogaev, E. I. (2018). Enhancement of Declarative Memory: From Genetic Regulation to Non-invasive Stimulation. *Biochemistry (Moscow)* 2018 83:9, 83(9), 1124–1138.
<https://doi.org/10.1134/S0006297918090146>
- Budreck, E. C., & Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *European Journal of Neuroscience*, 26(7), 1738–1748. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05842.X>
- Buttgereit, F., & Brand, M. D. (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 312(1), 163–167.
<https://doi.org/10.1042/bj3120163>
- Canitano, R. (2007). Epilepsy in autism spectrum disorders. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 16(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-0563-2>
- Cao, X., & Tabuchi, K. (2017). Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroligins and neurodevelopmental disorders. *Neuroscience Research*, 116, 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2016.09.005>
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J., & Pandolfi, P. P. (2008a). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3065–3074.
<https://doi.org/10.1172/JCI34739>
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J., & Pandolfi, P. P. (2008b). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3065–3074.
<https://doi.org/10.1172/JCI34739>
- Chanda, S., Aoto, J., Lee, S. J., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2015). Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroligin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking. *Molecular Psychiatry* 2016 21:2, 21(2), 169–177.
<https://doi.org/10.1038/mp.2015.20>

- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., & Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp.*, 403–410. <https://www.researchgate.net/publication/12307814>
- Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R. D., & Alberini, C. M. (2011). A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 2011 469:7331, 469(7331), 491–497. <https://doi.org/10.1038/nature09667>
- Chih, B., Engelman, H., & Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, 307(5713), 1324–1328. <https://doi.org/10.1126/science.1107470>
- Chini, M., & Hanganu-Opatz, I. L. (2021). Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans. *Trends in Neurosciences*, 44(3), 227–240. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.10.017>
- Choi, Y. J., di Nardo, A., Kramvis, I., Meikle, L., Kwiatkowski, D. J., Sahin, M., & He, X. (2008). Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation. *Genes and Development*, 22(18), 2485–2495. <https://doi.org/10.1101/gad.1685008>
- Chubykin, A. A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P., & Südhof, T. C. (2005). Dissection of Synapse Induction by Neuroligins: EFFECT OF A NEUROLIGIN MUTATION ASSOCIATED WITH AUTISM. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 22365–22374. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410723200>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 33, Issue 1, pp. 18–41). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Cloëtta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., Atanasoski, S., & Rüegg, M. A. (2013). Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 7799–7810. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013>
- Cooper, A., Butto, T., Hammer, N., Jagannath, S., Fend-Guella, D. L., Akhtar, J., Radyushkin, K., Lesage, F., Winter, J., Strand, S., Roeper, J., Zechner, U., & Schweiger, S. (2020). Inhibition of histone deacetylation rescues phenotype in a mouse model of Birk-Barel intellectual disability syndrome. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13918-4>
- Craig, A. M., & Kang, Y. (2007). Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 43–52). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.011>

- Crino, P. B. (2015). mTOR signaling in epilepsy: Insights from malformations of cortical development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4), a022442. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022442>
- Crino, P. B., Nathanson, K. L., & Henske, E. P. (2006). The Tuberous Sclerosis Complex. *New England Journal of Medicine*, 355(13), 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMra055323>
- Cruz, E., Descalzi, G., Steinmetz, A., Scharfman, H. E., Katzman, A., & Alberini, C. M. (2021). CIM6P/IGF-2 Receptor Ligands Reverse Deficits in Angelman Syndrome Model Mice. *Autism Research*, 14(1), 29–45. <https://doi.org/10.1002/AUR.2418>
- Curatolo, P., & Bombardieri, R. (2007). Tuberous sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 87, pp. 129–151). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)87009-6](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)87009-6)
- Curatolo, P., Moavero, R., & de Vries, P. J. (2015). Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 733–745). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00069-1)
- Curatolo, P., Porfirio, M. C., Manzi, B., & Seri, S. (2004). Autism in tuberous sclerosis. In *European Journal of Paediatric Neurology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 327–332). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2004.08.005>
- Curatolo, P., Verdecchia, M., & Bombardieri, R. (2002). Tuberous sclerosis complex: A review of neurological aspects. In *European Journal of Paediatric Neurology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 15–23). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1053/ejpn.2001.0538>
- Cusmai, R., Moavero, R., Bombardieri, R., Vigevano, F., & Curatolo, P. (2011). Long-term neurological outcome in children with early-onset epilepsy associated with tuberous sclerosis. *Epilepsy & Behavior*, 22(4), 735–739. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2011.08.037>
- Dabora, S. L., Kwiatkowski, D. J., Franz, D. N., Roberts, P. S., Nieto, A., Chung, J., Choy, Y. S., Reeve, M. P., Thiele, E., Egelhoff, J. C., Kasprzyk-Obara, J., & Domanska-Pakiela, D. (2001). Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *American Journal of Human Genetics*, 68(1), 64–80. <https://doi.org/10.1086/316951>
- Dahlhaus, R., Hines, R. M., Eadie, B. D., Kannangara, T. S., Hines, D. J., Brown, C. E., Christie, B. R., & El-Hussefani, A. (2010). Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by

- altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. *Hippocampus*, 20(2), 305–322. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20630>
- Dasgupta, B., & Gutmann, D. H. (2005). Neurofibromin regulates neural stem cell proliferation, survival, and astroglial differentiation in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, 25(23), 5584–5594. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4693-04.2005>
- Davis, S., Bozon, B., & Laroche, S. (2003). How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? *Behavioural Brain Research*, 142(1–2), 17–30. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00421-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00421-7)
- de Jaco, A., Mango, D., de Angelis, F., Favaloro, F. L., Andolina, D., Nisticò, R., Fiori, E., Colamartino, M., & Pascucci, T. (2017). Unbalance between Excitation and Inhibition in Phenylketonuria, a Genetic Metabolic Disease Associated with Autism. *International Journal of Molecular Sciences 2017*, Vol. 18, Page 941, 18(5), 941. <https://doi.org/10.3390/IJMS18050941>
- Deacon, R. M. J. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature Protocols*, 1(3), 1117–1119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170>
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience 2003 6:7*, 6(7), 708–716. <https://doi.org/10.1038/nn1074>
- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., & Robertsen, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature 1990 345:6270*, 345(6270), 78–80. <https://doi.org/10.1038/345078a0>
- Devlin, B., & Scherer, S. W. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 22, Issue 3, pp. 229–237). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.03.002>
- Dibble, C. C., & Cantley, L. C. (2015). Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 9, pp. 545–555). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.002>
- Dibble, C. C., Elis, W., Menon, S., Qin, W., Klekota, J., Asara, J. M., Finan, P. M., Kwiatkowski, D. J., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2012). TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, 47(4), 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.009>
- Dickinson, A., Jones, M., & Milne, E. (2016). Measuring neural excitation and inhibition in autism: Different approaches, different findings and different interpretations. *Brain Research*, 1648, 277–289. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.07.011>

- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H., & Tenzer, S. (2014). Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature Methods*, *11*(2), 167–170. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2767>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., & Tenzer, S. (2016). Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nature Protocols*, *11*(4), 795–812. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.042>
- Dong, N., Qi, J., & Chen, G. (2007). Molecular reconstitution of functional GABAergic synapses with expression of neuroligin-2 and GABAA receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *35*(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2007.01.013>
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. In *Neuron* (Vol. 88, Issue 1, pp. 20–32). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, *39*(2), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- DY, C., SA, S., A, G.-O., B, S.-R., G, P., D, B.-M., RD, B., & CM, A. (2011). A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, *469*(7331), 491–499. <https://doi.org/10.1038/NATURE09667>
- Ebrahimi-Fakhari, D., Meyer, S., Vogt, T., Pföhler, C., & Müller, C. S. L. (2017). Dermatologische Manifestationen der tuberösen Sklerose (TSC). *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, *15*(7), 695–701. https://doi.org/10.1111/ddg.13264_g
- Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J., Ramesh, V., & Silva, A. J. (2008a). Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(8), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>
- Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J., Ramesh, V., & Silva, A. J. (2008b). Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(8), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>

- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: A new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(11), 732–744. <https://doi.org/10.1038/nrn3827>
- EKER, R. (1954). FAMILIAL RENAL ADENOMAS IN WISTAR RATS: A Preliminary Report. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, *34*(6), 554–562. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1954.tb00301.x>
- Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease Models & Mechanisms*, *9*(10), 1079. <https://doi.org/10.1242/DMM.026120>
- Endersby, R., & Baker, S. J. (2008). PTEN signaling in brain: Neuropathology and tumorigenesis. In *Oncogene* (Vol. 27, Issue 41, pp. 5416–5430). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.239>
- Ess, K. C., Kamp, C. A., Tu, B. P., & Gutmann, D. H. (2005). Developmental origin of subependymal giant cell astrocytoma in tuberous sclerosis complex. *Neurology*, *64*(8), 1446–1449. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000158653.81008.49>
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2011). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(33), 13764–13769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111093108>
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B., & Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO Journal*, *27*(14), 1932–1943. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.120>
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*, *28*(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00084-2)
- Feng, J., Schroer, R., Yan, J., Song, W., Yang, C., Bockholt, A., Cook, E. H., Skinner, C., Schwartz, C. E., & Sommer, S. S. (2006). High frequency of neurexin 1 β signal peptide structural variants in patients with autism. *Neuroscience Letters*, *409*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.017>
- Feyder, M., Karlsson, R. M., Mathur, P., Lyman, M., Bock, R., Momenan, R., Munasinghe, J., Scattoni, M. L., Ihne, J., Camp, M., Graybeal, C., Strathdee, D., Begg, A., Alvarez, V. A., Kirsch, P., Rietschel, M., Cichon, S., Walter, H., Meyer-

- Lindenberg, A., ... Holmes, A. (2010). Association of mouse Dlg4 (PSD-95) gene deletion and human DLG4 gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome. *American Journal of Psychiatry*, *167*(12), 1508–1517. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2010.10040484/ASSET/IMAGES/LARGE/APPI.AJP.2010.1508C.JPEG>
- Fingar, D. C., & Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. In *Oncogene* (Vol. 23, Issue 18, pp. 3151–3171). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207542>
- Franz, D. N., Belousova, E., Sparagana, S., Bebin, E. M., Frost, M., Kuperman, R., Witt, O., Kohrman, M. H., Flamini, J. R., Wu, J. Y., Curatolo, P., de Vries, P. J., Whittemore, V. H., Thiele, E. A., Ford, J. P., Shah, G., Cauwel, H., Lebowitz, D., Sahmoud, T., & Jozwiak, S. (2013). Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): A multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*, *381*(9861), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61134-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61134-9)
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2006a). mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*, *16*(18), 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>
- Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2006b). mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology*, *16*(18), 1865–1870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.001>
- Fryer, A. E., Connor, J. M., Povey, S., Yates, J. R. W., Chalmers, A., Fraser, I., Yates, A. D., & Osborne, J. P. (1987). EVIDENCE THAT THE GENE FOR TUBEROUS SCLEROSIS IS ON CHROMOSOME 9. *The Lancet*, *329*(8534), 659–661. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)90416-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)90416-8)
- Gail Williams, P., Sears, L. L., & Allard, A. (2004). Sleep problems in children with autism. *Journal of Sleep Research*, *13*(3), 265–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2004.00405.x>
- Gan, X., Wang, J., Wang, C., Sommer, E., Kozasa, T., Srinivasula, S., Alessi, D., Offermanns, S., Simon, M. I., & Wu, D. (2012). PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC- δ phosphorylation and cell migration downstream of G α 12. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 686–696. <https://doi.org/10.1038/ncb2507>

- García-Martínez, J. M., & Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochemical Journal*, *416*(3), 375–385. <https://doi.org/10.1042/BJ20081668>
- GILLBERG, C. (2008). Subgroups in autism: are there behavioural phenotypes typical of underlying medical conditions? *Journal of Intellectual Disability Research*, *36*(3), 201–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1992.tb00508.x>
- Gingras, A.-C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., & Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. In *genesdev.cshlp.org*. www.genesdev.org
- Glaze, D. G., Hrachovy, R. A., Frost, J. D., Kellaway, P., & Zion, T. E. (1988). Prospective study of outcome of infants with infantile spasms treated during controlled studies of ACTH and prednisone. *The Journal of Pediatrics*, *112*(3), 389–396. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(88\)80318-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(88)80318-4)
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *1*(2), 172–181. <https://doi.org/10.1007/S11689-009-9023-X/FIGURES/4>
- Goh, S., Butler, W., & Thiele, E. A. (2004). Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex. *Neurology*, *63*(8), 1457–1461. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000142039.14522.1A>
- Goodman, M., Lamm, S. H., Engel, A., Shepherd, C. W., Houser, O. W., & Gomez, M. R. (1997). Cortical tuber count: A biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *Journal of Child Neurology*, *12*(2), 85–90. <https://doi.org/10.1177/088307389701200203>
- Goorden, S. M. I., van Woerden, G. M., van der Weerd, L., Cheadle, J. P., & Elgersma, Y. (2007a). Cognitive Deficits in Tsc1 / Mice in the Absence of Cerebral Lesions and Seizures. *Ann Neurol*, *62*(6), 648–655. <https://doi.org/10.1002/ana.21317>
- Goorden, S. M. I., van Woerden, G. M., van der Weerd, L., Cheadle, J. P., & Elgersma, Y. (2007b). Cognitive Deficits in Tsc1 / Mice in the Absence of Cerebral Lesions and Seizures. *Ann Neurol*, *62*(6), 648–655. <https://doi.org/10.1002/ana.21317>
- Graber, T. E., McCamphill, P. K., & Sossin, W. S. (2013). A recollection of mTOR signaling in learning and memory. In *Learning and Memory* (Vol. 20, Issue 10, pp. 518–530). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/lm.027664.112>

- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins. *Cell*, *119*(7), 1013–1026. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.11.035>
- Grajkowska, W., Kotulska, K., ... E. J.-F., & 2011, undefined. (n.d.). Subependymal giant cell astrocytomas with atypical histological features mimicking malignant gliomas. *Academia.Edu*. Retrieved February 11, 2021, from https://www.academia.edu/download/43545318/Subependymal_giant_cell_astrocytomas_wit20160309-813-7c17ie.pdf
- Gray, P., & Cooney, J. (1982). Stress-induced responses and open-field behavior in estrous and nonestrous mice. *Physiology and Behavior*, *29*(2), 287–292. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90017-8)
- Green, A. J., Smith, M., & Yates, J. R. W. (1994). Loss of heterozygosity on chromosome 16p 13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients. *Nature Genetics*, *6*(2), 193–196. <https://doi.org/10.1038/ng0294-193>
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & 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*(14), 5089–5098. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-14-05089.2001>
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001). Cellular Imaging of zif268 Expression in the Hippocampus and Amygdala during Contextual and Cued Fear Memory Retrieval: Selective Activation of Hippocampal CA1 Neurons during the Recall of Contextual Memories. *Journal of Neuroscience*, *21*(6), 2186–2193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-02186.2001>
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., & Hannan, R. D. (2003). mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF†. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(23), 8862–8877. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8862-8877.2003>
- Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I., & Avruch, J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(42), 26457–26463. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457>
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S. I., Natsume, T., Guan, J. L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome

- formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 181(3), 497–510.
<https://doi.org/10.1083/JCB.200712064>
- Harter, P. N., Jennewein, L., Baumgarten, P., Ilina, E., Burger, M. C., Thiebold, A. L., Tichy, J., Zörnig, M., Senft, C., Steinbach, J. P., Mittelbronn, M., & Ronellenfitsch, M. W. (2015). Immunohistochemical Assessment of Phosphorylated mTORC1-Pathway Proteins in Human Brain Tumors. *PLOS ONE*, 10(5), e0127123.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0127123>
- Heitman, J., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022), 905–909.
<https://doi.org/10.1126/science.1715094>
- Henry, F. E., Hockeimer, W., Chen, A., Mysore, S. P., & Sutton, M. A. (2017). Mechanistic target of rapamycin is necessary for changes in dendritic spine morphology associated with long-term potentiation. *Molecular Brain*, 10(1), 50.
<https://doi.org/10.1186/s13041-017-0330-y>
- Henske, E. P., Józwiak, S., Kingswood, J. C., Sampson, J. R., & Thiele, E. A. (2016). Tuberous sclerosis complex. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.35>
- Hines, R. M., Wu, L., Hines, D. J., Steenland, H., Mansour, S., Dahlhaus, R., Singaraja, R. R., Cao, X., Sammler, E., Hormuzdi, S. G., Zhuo, M., & El-Husseini, A. (2008). Synaptic Imbalance, Stereotypies, and Impaired Social Interactions in Mice with Altered Neuroligin 2 Expression. *Journal of Neuroscience*, 28(24), 6055–6067.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0032-08.2008>
- Hoeffler, C. A., Tang, W., Wong, H., Santillan, A., Patterson, R. J., Martinez, L. A., Tejada-Simon, M. v., Paylor, R., Hamilton, S. L., & Klann, E. (2008). Removal of FKBP12 Enhances mTOR-Raptor Interactions, LTP, Memory, and Perseverative/Repetitive Behavior. *Neuron*, 60(5), 832–845.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.037>
- Holmes, G. L., Stafstrom, C. E., Baraban, S. C., Bertram, E., Bolton, P., Brooks-Kayal, A., Chugani, H. T., Coulter, D., Crino, P., Delanerolle, N. C., Devinsky, O., Jacobs, M., Jensen, F. E., Kapur, J., Khazipov, R., Kirchstein, T., Lonsdale, J., Mathern, G., Riviello, J., ... Whittemore, V. H. (2007). Tuberous Sclerosis Complex and Epilepsy: Recent Developments and Future Challenges. *Epilepsia*, 48(4), 617–630.
<https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2007.01035.X>
- Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123(4), 569–580.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>

- Horder, J., Petrinovic, M. M., Mendez, M. A., Bruns, A., Takumi, T., Spooren, W., Barker, G. J., Künnecke, B., & Murphy, D. G. (2018). Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Translational Psychiatry* 2018 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0155-1>
- Hörnberg, H., Pérez-Garci, E., Schreiner, D., Hatstatt-Burklé, L., Magara, F., Baudouin, S., Matter, A., Nacro, K., Pecho-Vrieseling, E., & Scheiffele, P. (2020). Rescue of oxytocin response and social behaviour in a mouse model of autism. *Nature*, 584(7820), 252–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2563-7>
- Howe, C. J., Serfontein, J., Nisbet, R. E. R., & de Vries, P. J. (2015). Viewing animal models for tuberous sclerosis complex in the light of evolution. In *Organism Models of Autism Spectrum Disorders* (Vol. 100, pp. 99–115). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2250-5_4
- Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., Lim, D., Peterson, T. R., Choi, Y., Gray, N. S., Yaffe, M. B., Marto, J. A., & Sabatini, D. M. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332(6035), 1317–1322. <https://doi.org/10.1126/science.1199498>
- Hsu, W. L., Chung, H. W., Wu, C. Y., Wu, H. I., Lee, Y. T., Chen, E. C., Fang, W., & Chang, Y. C. (2015). Glutamate stimulates local protein synthesis in the axons of rat cortical neurons by activating α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors and metabotropic glutamate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 20748–20760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.638023>
- Hu, X., Luo, J. H., & Xu, J. (2015). The interplay between synaptic activity and neuroligin function in the CNS. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/498957>
- Huang, J., & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: A molecular switchboard controlling cell growth. In *Biochemical Journal* (Vol. 412, Issue 2, pp. 179–190). Portland Press. <https://doi.org/10.1042/BJ20080281>
- Huang, W., Zhu, P. J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K., Roman, G., & Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature Neuroscience*, 16(4), 441–448. <https://doi.org/10.1038/nn.3351>
- Hübener, M., & Bonhoeffer, T. (2010). Searching for Engrams. In *Neuron* (Vol. 67, Issue 3, pp. 363–371). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.033>

- Huguet, G., Ey, E., & Bourgeron, T. (2013). The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *14*(1), 191–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153431>
- Humphrey, A., MacLean, C., Ploubidis, G. B., Granader, Y., Clifford, M., Haslop, M., Neville, B. G. R., Yates, J. R. W., & Bolton, P. F. (2014). Intellectual development before and after the onset of infantile spasms: A controlled prospective longitudinal study in tuberous sclerosis. *Epilepsia*, *55*(1), 108–116. <https://doi.org/10.1111/EPI.12484>
- Humphrey, A., Williams, J., Pinto, E., & Bolton, P. F. (2004). A prospective longitudinal study of early cognitive development in tuberous sclerosis: A clinic based study. *European Child and Adolescent Psychiatry*, *13*(3), 159–165. <https://doi.org/10.1007/s00787-004-0383-1>
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K.-L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO Journal*, *27*(14), 1919–1931. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.119>
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, *4*(9), 648–657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Iwamoto, T., & Ouchi, Y. (2014). Emerging evidence of insulin-like growth factor 2 as a memory enhancer: a unique animal model of cognitive dysfunction with impaired adult neurogenesis. *Reviews in the Neurosciences*, *25*(4), 559–574. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2014-0010>
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, *6*(11), 1122–1128. <https://doi.org/10.1038/ncb1183>
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Nydén, A., Philippe, A., Cohen, D., Chabane, N., Mouren-Siméoni, M. C., Brice, A., Sponheim, E., Spurkland, I., ... van Maldergem, L. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, *34*(1), 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoquaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., Frahm, J., Fischer, J., Bourgeron, T., Ehrenreich, H., & Brose, N. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1710–1715.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0711555105>
- Jansen, F. E., Vincken, K. L., Algra, A., Anbeek, P., Braams, O., Nellist, M., Zonnenberg, B. A., Jennekens-Schinkel, A., van den Ouweland, A., Halley, D., van Huffelen, A. C., & van Nieuwenhuizen, O. (2008). Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition. *Neurology*, 70(12), 916–923.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000280579.04974.c0>
- Jedlicka, P., Vnencak, M., Krueger, D. D., Jungenitz, T., Brose, N., & Schwarzacher, S. W. (2015). Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo. *Brain Structure & Function*, 220(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/S00429-013-0636-1>
- Jeste, S., Sahin, M., Bolton, P., Ploubidis, G., & Humphrey, A. (2008). Characterization of autism in young children with tuberous sclerosis complex. *Journal of Child Neurology*, 23(5), 520–525. <https://doi.org/10.1177/0883073807309788>
- Johannessen, C. M., Reczek, E. E., James, M. F., Brems, H., Legius, E., & Cichowski, K. (2005). The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8573–8578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503224102>
- Jones, A. C., Shyamsundar, M. M., Thomas, M. W., Maynard, J., Idziaszczyk, S., Tomkins, S., Sampson, J. R., & Cheadle, J. P. (1999). Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2 - And phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 64(5), 1305–1315. <https://doi.org/10.1086/302381>
- Józwiak, S., Schwartz, R. A., Janniger, C. K., & Bielicka-Cymerman, J. (2000). Usefulness of diagnostic criteria of tuberous sclerosis complex in pediatric patients. *Journal of Child Neurology*, 15(10), 652–659. <https://doi.org/10.1177/088307380001501003>
- Juranek, J., Felipek, P. A., Berenji, G. R., Modahl, C., Osann, K., & Spence, M. A. (2006). Association between amygdala volume and anxiety level: Magnetic resonance imaging (MRI) study in autistic children. *Journal of Child Neurology*, 21(12), 1051–1058. <https://doi.org/10.1177/7010.2006.00237>
- Kandt, R. S., Haines, J. L., Smith, M., Northrup, H., Gardner, R. J. M., Shore, M. P., Dumars, K., Roach, E. S., Steingold, S., Waif, S., Blanton, S. H., Flodman, P., Kwiatkowski, D. J., Jewell, A., Weber, J. L., Roses, A. D., & Pericak-Vancel, M. A. (1992). Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. In *nature.com*.
<http://www.nature.com/naturegenetics>

- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child*, 2, 217–250. http://mail.neurodiversity.com/library_kanner_1943.pdf
- Kemper, T. L., & Bauman, M. L. (1993). The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. In *Neurologic Clinics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 175–187). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(18\)30176-2](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(18)30176-2)
- Kim, Y. C., & Guan, K. L. (2015). mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 125, Issue 1, pp. 25–32). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI73939>
- Kleijer, K. T. E., Schmeisser, M. J., Krueger, D. D., Boeckers, T. M., Scheiffele, P., Bourgeron, T., Brose, N., & Burbach, J. P. H. (2014). Neurobiology of autism gene products: Towards pathogenesis and drug targets. In *Psychopharmacology* (Vol. 231, Issue 6, pp. 1037–1062). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3403-3>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/35101031>
- Kotulska, K., Jurkiewicz, E., Domańska-Pakieła, D., Grajkowska, W., Mander, M., Borkowska, J., & Józwiak, S. (2014). Epilepsy in newborns with tuberous sclerosis complex. *European Journal of Paediatric Neurology*, 18(6), 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.06.009>
- Kozłowski, P., Roberts, P., Dabora, S., Franz, D., Bissler, J., Northrup, H., Au, K. S., Lazarus, R., Domanska-Pakieła, D., Kotulska, K., Jozwiak, S., & Kwiatkowski, D. J. (2007). Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations. *Human Genetics*, 121(3–4), 389–400. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0308-9>
- Kristof, A. S., Li, P. Z., Major, P., & Landry, J. S. (2015). Lymphangiomyomatosis and tuberous sclerosis complex in Quebec: Prevalence and health-care utilization. *Chest*, 148(2), 444–449. <https://doi.org/10.1378/chest.14-3095>
- Kwiatkowski, D. J., & Manning, B. D. (2005). Tuberous sclerosis: A GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 14, Issue SUPPL. 2, pp. R251–R258). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi260>
- Kwiatkowski, D. J., Zhang, H., Bandura, J. L., Heiberger, K. M., Glogauer, M., el-Hashemite, N., & Onda, H. (2002). A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. *Human Molecular Genetics*, 11(5), 525–534. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.5.525>

- Kwiatkowski, D., Whittemore, V., & Thiele, E. (2011). *Tuberous sclerosis complex: Genes, clinical features and therapeutics*. https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=PsERtGYeS5gC&oi=fnd&pg=PT13&dq=Kwiatkowski+D.J.,+Whittemore+V.H.,+and+Thiele+E.A.,+Tuberous+sclerosis+complex:+genes,+clinical+features+and+therapeutics.+2011:+John+Wiley+%26+Sons.&ots=hG9vLZXH_s&sig=L7bAIQ5ugNTgQvEzXWmSCHtXlkw
- LAEMMLI, & U. (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680–686. <https://ci.nii.ac.jp/naid/20001401526>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). MTOR signaling in growth control and disease. In *Cell* (Vol. 149, Issue 2, pp. 274–293). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lavenex, P., & Amaral, D. G. (2000). Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 10(4), 420–430. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<420::AID-HIPO8>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<420::AID-HIPO8>3.0.CO;2-5)
- Lenz, G., & Avruch, J. (2005). Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38121–38124. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500363200>
- LeRoith, D., & Roberts, C. T. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters*, 195(2), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00159-9)
- Levine, D., Barnes, P., Korf, B., & Edelman, R. (2000). Tuberous Sclerosis in the Fetus. *American Journal of Roentgenology*, 175(4), 1067–1069. <https://doi.org/10.2214/ajr.175.4.1751067>
- Levinson, J. N., & El-Husseini, A. (2005). Building excitatory and inhibitory synapses: Balancing neuroligin partnerships. In *Neuron* (Vol. 48, Issue 2, pp. 171–174). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.017>
- Levinson, J. N., Chéry, N., Huang, K., Wong, T. P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang, Y. T., & El-Husseini, A. (2005). Neuroligins Mediate Excitatory and Inhibitory Synapse Formation: INVOLVEMENT OF PSD-95 AND NEUREXIN-1 β IN NEUROLIGIN-INDUCED SYNAPTIC SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17312–17319. <https://doi.org/10.1074/JBC.M413812200>
- Li, C., Lee, P. S., Sun, Y., Gu, X., Zhang, E., Guo, Y., Wu, C. L., Auricchio, N., Priolo, C., Li, J., Csibi, A., Parkhitko, A., Morrison, T., Planaguma, A., Kazani, S., Israel, E., Xu, K. F., Henske, E. P., Blenis, J., ... Yu, J. J. (2014). Estradiol and mTORC2 cooperate to enhance prostaglandin biosynthesis and tumorigenesis in TSC2-

- deficient LAM cells. *Journal of Experimental Medicine*, 211(1), 15–28. <https://doi.org/10.1084/jem.20131080>
- Li, M., Cui, Z., Niu, Y., Liu, B., Fan, W., Yu, D., & Deng, J. (2010). Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. *Brain Research Bulletin*, 81(1), 107–113. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2009.08.028>
- Li, X., & Gao, T. (2014). mTORC2 phosphorylates protein kinase C ζ to regulate its stability and activity. *EMBO Reports*, 15(2), 191–198. <https://doi.org/10.1002/embr.201338119>
- Lipton, J. O., & Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. In *Neuron* (Vol. 84, Issue 2, pp. 275–291). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 183–203). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75(1), 59–72. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80084-4)
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*, 10(3), 457–468. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6)
- Longa, L., Saluto, A., Brusco, A., Polidoro, S., Padovan, S., Allavena, A., Carbonara, C., Grosso, E., & Migone, N. (2001). TSC1 and TSC2 deletions differ in size, preference for recombinatorial sequences, and location within the gene. *Human Genetics*, 108(2), 156–166. <https://doi.org/10.1007/s004390100460>
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 307–318). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>
- Maheshwar, M. M., Cheadle, J. P., Jones, A. C., Myring, J., Fryer, A. E., Harris, P. C., & Sampson, J. R. (1997). The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1991–1996. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1991>
- Mandell, J. W. (2008). Immunohistochemical assessment of protein phosphorylation state: The dream and the reality. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(3), 465–471. <https://doi.org/10.1007/S00418-008-0474-Z/FIGURES/3>

- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. In *Science* (Vol. 298, Issue 5600, pp. 1912–1934). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Mao, Z., & Zhang, W. (2018). Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7, p. 2043). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19072043>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 23, pp. 649–711). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., & Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes and Development*, 18(4), 423–434. <https://doi.org/10.1101/gad.285504>
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 0(JAN2016), 78. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2015.00078>
- Mizuguchi, M., Takashima, S., Yamanouchi, H., Nakazato, Y., Mitani, H., & Hino, O. (2000). Novel Cerebral Lesions in the Eker Rat Model of Tuberous Sclerosis: Cortical Tuber and Anaplastic Ganglioglioma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(3), 188–196. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.3.188>
- Mohamed, A. R., Bailey, C. A., Freeman, J. L., Maixner, W., Jackson, G. D., & Harvey, A. S. (2012). Intrinsic epileptogenicity of cortical tubers revealed by intracranial EEG monitoring. *Neurology*, 79(23), 2249–2257. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182768923>
- Monday, H. R., Younts, T. J., & Castillo, P. E. (2018). Long-Term Plasticity of Neurotransmitter Release: Emerging Mechanisms and Contributions to Brain Function and Disease. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Neuro-080317-062155>, 41, 299–322. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-080317-062155>
- Mueller, C., Edmiston, K. H., Carpenter, C., Gaffney, E., Ryan, C., Ward, R., White, S., Memeo, L., Colarossi, C., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., & Espina, V. (2011). One-step preservation of phosphoproteins and tissue morphology at room temperature for diagnostic and research specimens. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023780>

- Murphy, L. O., & Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(5), 268–275. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2006.03.009>
- Napolioni, V., & Curatolo, P. (2008). Genetics and Molecular Biology of Tuberous Sclerosis Complex. *Current Genomics*, 9(7), 475–487. <https://doi.org/10.2174/138920208786241243>
- Nellist, M., Brouwer, R. W. W., Kockx, C. E. M., van Veghel-Plandsoen, M., Withagen-Hermans, C., Prins-Bakker, L., Hoogeveen-Westerveld, M., Mrcic, A., van den Berg, M. M. P., Koopmans, A. E., de Wit, M. C., Jansen, F. E., Maat-Kievit, A. J. A., van den Ouweland, A., Halley, D., de Klein, A., & van IJcken, W. F. J. (2015). Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified and mutations. *BMC Medical Genetics*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0155-4>
- Nellist, M., Sancak, O., Goedbloed, M. A., Veghel-Plandsoen, M. van, Maat-Kievit, A., Lindhout, D., Eussen, B. H., de Klein, A., Halley, D. J. J., & Ouweland, A. M. W. van den. (2005). Large Deletion at the *TSC1* Locus in a Family with Tuberous Sclerosis Complex. *Genetic Testing*, 9(3), 226–230. <https://doi.org/10.1089/gte.2005.9.226>
- Newton, S. S., Dow, A., Terwilliger, R., & Duman, R. (2002). A simplified method for combined immunohistochemistry and in-situ hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections. *Brain Research Protocols*, 9(3), 214–219. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(02\)00148-4](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(02)00148-4)
- Nie, D., di Nardo, A., Han, J. M., Baharanyi, H., Kramvis, I., Huynh, T., Dabora, S., Codeluppi, S., Paolo Pandolfi, P., Pasquale, E. B., & Sahin, M. (2010). Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2477>
- Nikoletopoulou, V., Sidiropoulou, K., Kallergi, E., Dalezios, Y., & Tavernarakis, N. (2017). Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity. *Cell Metabolism*, 26(1), 230–242.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.005>
- Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3963–3966. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3963>
- Northrup, H., Krueger, D. A., Roberds, S., Smith, K., Sampson, J., Korf, B., Kwiatkowski, D. J., Mowat, D., Nellist, M., Povey, S., de Vries, P., Byars, A., Dunn, D., Ess, K., Hook, D., Jansen, A., King, B., Sahin, M., Whittemore, V., ... Frost, M. D. (2013). Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: Recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference.

- Pediatric Neurology*, 49(4), 243–254.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001>
- O’Callaghan, F. J. K., Shiell, A. W., Osborne, J. P., & Martyn, C. N. (1998). Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis. *Lancet*, 351(9114), 1490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)78872-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)78872-3)
- O’Donnell, A., Odrowaz, Z., & Sharrocks, A. D. (2012). Immediate-early gene activation by the MAPK pathways: what do and don’t we know? *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 58–66. <https://doi.org/10.1042/BST20110636>
- Oh, W. J., & Jacinto, E. (2011). mTOR complex 2 signaling and functions. In *Cell Cycle* (Vol. 10, Issue 14, pp. 2305–2316). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.10.14.16586>
- Onda, H., Lueck, A., Marks, P. W., Warren, H. B., & Kwiatkowski, D. J. (1999). Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsoin and are influenced by genetic background. *Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 687–695. <https://doi.org/10.1172/JCI7319>
- Orlova, K. A., & Crino, P. B. (2010). The tuberous sclerosis complex. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1184, pp. 87–105). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05117.x>
- Ouchi, Y., Banno, Y., Shimizu, Y., Ando, S., Hasegawa, H., Adachi, K., & Iwamoto, T. (2013). Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Working Memory Deficits in the Dgcr8-Deficient Mouse Model of 22q11.2 Deletion-Associated Schizophrenia Can Be Rescued by IGF2. *Journal of Neuroscience*, 33(22), 9408–9419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2700-12.2013>
- Overwater, I. E., Bindels-de Heus, K., Rietman, A. B., ten Hoopen, L. W., Vergouwe, Y., Moll, H. A., & de Wit, M.-C. Y. (2015). Epilepsy in children with tuberous sclerosis complex: Chance of remission and response to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 56(8), 1239–1245. <https://doi.org/10.1111/epi.13050>
- Pardo, M., Cheng, Y., Sitbon, Y. H., Lowell, J. A., Grieco, S. F., Worthen, R. J., Desse, S., & Barreda-Diaz, A. (2019). Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neuroscience Research*, 149, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2018.10.012>
- Park, K. K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P. D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M., & He, Z. (2008). Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science*, 322(5903), 963–966. <https://doi.org/10.1126/science.1161566>

- Pascual-Lucas, M., Silva, S. V. da, Scala, M. di, Garcia-Barroso, C., González-Aseguinolaza, G., Mülle, C., Alberini, C. M., Cuadrado-Tejedor, M., & Garcia-Osta, A. (2014a). Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1246–1262. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201404228>
- Pascual-Lucas, M., Silva, S. V. da, Scala, M. di, Garcia-Barroso, C., González-Aseguinolaza, G., Mülle, C., Alberini, C. M., Cuadrado-Tejedor, M., & Garcia-Osta, A. (2014b). Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1246–1262. <https://doi.org/10.15252/EMMM.201404228>
- Pascual-Lucas, M., Viana da Silva, S., di Scala, M., Garcia-Barroso, C., González-Aseguinolaza, G., Mülle, C., Alberini, C. M., Cuadrado-Tejedor, M., & Garcia-Osta, A. (2014). Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1246–1262. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404228>
- Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates - George Paxinos, Keith B.J. Franklin - Google Books*. (n.d.). Retrieved December 4, 2020, from <https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=x3aQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=mouse+brain+in+stereotaxic+coordinates&ots=mAANqYMIIdA&sig=csiFP rLJboxlF90X7rvMQJ5Z6jA#v=onepage&q=mouse%20brain%20in%20stereotaxic%20coordinates&f=false>
- Pearce, L. R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A. F. M., Gourlay, R., Magnuson, M. A., & Alessi, D. R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochemical Journal*, 405(3), 513–522. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Perez-Alvarez, M. J., Gonzalez, M. V., Benito-Cuesta, I., & Wandosell, F. G. (2018). Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue FEB, p. 60). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00060>
- Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell*, 137(5), 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>

- Pilarski, R., Burt, R., Kohlman, W., Pho, L., Shannon, K. M., & Swisher, E. (2013). Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: Systematic review and revised diagnostic criteria. In *Journal of the National Cancer Institute* (Vol. 105, Issue 21, pp. 1607–1616). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt277>
- Radulovic, J., Kammermeier, J., & Spiess, J. (1998). Generalization of fear responses in C57BL/6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, *95*(2), 179–189. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00039-4)
- Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. *Journal of Neuroscience*, *25*(7), 1761–1768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>
- Ren, H., Yin, P., & Duan, C. (2008). IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. *Journal of Cell Biology*, *182*(5), 979–991. <https://doi.org/10.1083/JCB.200712110>
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A Novel Mouse Model for Acute and Long-Lasting Consequences of Early Life Stress. *Endocrinology*, *149*(10), 4892–4900. <https://doi.org/10.1210/EN.2008-0633>
- Rikhof, B., Jong, S. de, Suurmeijer, A. J., Meijer, C., & Graaf, W. T. van der. (2009). The insulin-like growth factor system and sarcomas. *The Journal of Pathology*, *217*(4), 469–482. <https://doi.org/10.1002/PATH.2499>
- Rinderknecht, E., & Humbel, R. E. (1978a). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biological Chemistry*, *253*(8), 2769–2776. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40889-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40889-1)
- Rinderknecht, E., & Humbel, R. E. (1978b). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Letters*, *89*(2), 283–286. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80237-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80237-3)
- Roderick, T. (1978). Further information on subline differences. *Faculty Research 1970 - 1979*. https://mouseion.jax.org/stfb1970_1979/855
- Roediger, H. L., Dudai, Y., Fitzpatrick, S. M., Loftus, E. F., Rubin, D. C., & Wixted, J. T. (2007). *Science of Memory: Concepts*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195310443.001.0001>
- Roth, J., Roach, E. S., Bartels, U., Józwiak, S., Koenig, M. K., Weiner, H. L., Franz, D. N., & Wang, H. Z. (2013). Subependymal giant cell astrocytoma: Diagnosis, screening, and treatment. Recommendations from the international tuberous

- sclerosis complex consensus conference 2012. *Pediatric Neurology*, 49(6), 439–444.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.017>
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78(1), 35–43.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3)
- Sampson, J. R. (2003). TSC1 and TSC2: Genes that are mutated in the human genetic disorder tuberous sclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 592–596.
<https://doi.org/10.1042/BST0310592>
- Sancak, O., Nellist, M., Goedbloed, M., Elfferich, P., Wouters, C., Maat-Kievit, A., Zonnenberg, B., Verhoef, S., Halley, D., & van den Ouweland, A. (2005). Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: Genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in tuberous sclerosis complex. *European Journal of Human Genetics*, 13(6), 731–741.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201402>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sato, A., Kasai, S., Kobayashi, T., Takamatsu, Y., Hino, O., Ikeda, K., & Mizuguchi, M. (2012). Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Nature Communications 2012 3:1*, 3(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2295>
- Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., de Rubeis, S., An, J. Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., ... Buxbaum, J. D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180(3), 568-584.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
- Schmeisser, M. J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A. V., Kuebler, A., Janssen, A. L., Udvardi, P. T., Shiban, E., Spilker, C., Balschun, D., Skryabin, B. v., Dieck, S. T., Smalla, K. H., Montag, D., Leblond, C. S., Faure, P., Torquet, N., le Sourd, A. M., ... Boeckers, T. M. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature 2012 486:7402*, 486(7402), 256–260.
<https://doi.org/10.1038/nature11015>
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods 2009 6:4*, 6(4), 275–277.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>

- Serfontein, J., Nisbet, R. E. R., Howe, C. J., & de Vries, P. J. (2011). Conservation of structural and functional elements of TSC1 and TSC2: A bioinformatic comparison across animal models. *Behavior Genetics*, *41*(3), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s10519-010-9440-3>
- Sharma, A., Hoeffler, C. A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S. M., Klann, E., & Suzanne Zukin, R. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*, *30*(2), 694–702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3696-09.2010>
- Shinar, D. M., Endo, N., Halperin, D., Rodan, G. A., & Weinreb, M. (1993). Differential expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in growing rat bone. *Endocrinology*, *132*(3), 1158–1167. <https://doi.org/10.1210/EN.132.3.1158>
- Silva, J. C., Gorenstein, M. v., Li, G. Z., Vissers, J. P. C., & Geromanos, S. J. (2006). Absolute quantification of proteins by LCMSE: A virtue of parallel MS acquisition. *Molecular and Cellular Proteomics*, *5*(1), 144–156. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500230-MCP200>
- Smolinsky, A. N., Bergner, C. L., LaPorte, J. L., & Kalueff, A. v. (2009). *Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression* (pp. 21–36). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_2
- Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009). Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *Journal of Neuroscience*, *29*(46), 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
- Sohal, V. S., & Rubenstein, J. L. R. (2019). Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *24*(9), 1248–1257. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0426-0>
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, *5*(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80023-9](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9)
- Steele, R. J., & Morris, R. G. M. (1999). Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, *9*(2), 118–136. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8)

- Steen, E., Terry, B. M., J. Rivera, E., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, 7(1), 63–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7107>
- Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G., & Alberini, C. M. (2018a). Insulin-like growth factor II targets the mTOR pathway to reverse autism-like phenotypes in mice. *Journal of Neuroscience*, 38(4), 1015–1029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-17.2017>
- Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G., & Alberini, C. M. (2018b). Insulin-Like Growth Factor II Targets the mTOR Pathway to Reverse Autism-Like Phenotypes in Mice. *Journal of Neuroscience*, 38(4), 1015–1029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-17.2017>
- Stern, S. A., Chen, D. Y., & Alberini, C. M. (2014). The effect of insulin and insulin-like growth factors on hippocampus- and amygdala-dependent long-term memory formation. *Learning and Memory*, 21(10), 556–563. <https://doi.org/10.1101/lm.029348.112>
- Stern, S. A., Kohtz, A. S., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2014). Enhancement of Memories by Systemic Administration of Insulin-Like Growth Factor II. *Neuropsychopharmacology* 2014 39:9, 39(9), 2179–2190. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.69>
- Stiedl, O., Radulovic, J., Lohmann, R., Birkenfeld, K., Palve, M., Kammermeier, J., Sananbenesi, F., & Spiess, J. (1999). Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. *Behavioural Brain Research*, 104(1–2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00047-9)
- Südhof, T. C. (2008a). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. In *Nature* (Vol. 455, Issue 7215, pp. 903–911). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Südhof, T. C. (2008b). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. In *Nature* (Vol. 455, Issue 7215, pp. 903–911). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M. R., Hammer, R. E., Liu, X., Powell, C. M., & Südhof, T. C. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318(5847), 71–76. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1146221/SUPPL_FILE/TABUCHI.SOM.PDF

- Takahashi, D. K., Dinday, M. T., Barbaro, N. M., & Baraban, S. C. (2004). Abnormal Cortical Cells and Astrocytomas in the Eker Rat Model of Tuberous Sclerosis Complex. *Epilepsia*, *45*(12), 1525–1530. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.23004.x>
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9760–9769. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004>
- Takeuchi, T., Duszkiwicz, A. J., & Morris, R. G. M. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: Encoding, storage and persistence. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 369, Issue 1633). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288>
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014a). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, *83*(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014b). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, *83*(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Taraszevska, A., Kroh, H., & Majchrowski, A. (1997). Subependymal giant cell astrocytoma: Clinical, histologic and immunohistochemical characteristic of 3 cases. *Folia Neuropathologica*, *35*(3), 181–186. <https://europepmc.org/article/med/9595853>
- Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005a). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nature Neuroscience* 2005 8:12, *8*(12), 1727–1734. <https://doi.org/10.1038/nn1566>
- Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005b). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nature Neuroscience*, *8*(12), 1727–1734. <https://doi.org/10.1038/nn1566>
- Tee, A. R., Fingar, D. C., Manning, B. D., Kwiatkowski, D. J., Cantley, L. C., & Blenis, J. (2002). Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to

- inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13571–13576. <https://doi.org/10.1073/pnas.202476899>
- The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. (1993a). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell*, 75(7), 1305–1315. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90618-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90618-Z)
- The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. (1993b). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell*, 75(7), 1305–1315. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90618-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90618-Z)
- Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R. M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N., & Rüegg, M. A. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *Journal of Cell Biology*, 201(2), 293–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205030>
- Traité théorique et pratique des maladies de la peau - P. Rayet - Google Books*. (n.d.). Retrieved February 9, 2021, from [https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=GYoPAAAAQAAJ&oi=fnd&pg=PA644&dq=Rayer+PFO+\(1835\)+Trait%C3%A9+theorique+et+pratique+des+maladies+de+la+peau.+2.+Aufl.+JB+Bailli%C3%A8re,+Paris&ots=u31R98jGTj&sig=klKA4W6FQy7zQVQtWSP-Xx_Q4SA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.de/books?hl=de&lr=&id=GYoPAAAAQAAJ&oi=fnd&pg=PA644&dq=Rayer+PFO+(1835)+Trait%C3%A9+theorique+et+pratique+des+maladies+de+la+peau.+2.+Aufl.+JB+Bailli%C3%A8re,+Paris&ots=u31R98jGTj&sig=klKA4W6FQy7zQVQtWSP-Xx_Q4SA#v=onepage&q&f=false)
- Trauner, M. A., Ruben, B. S., & Lynch, P. J. (2003). Segmental tuberous sclerosis presenting as unilateral facial angiofibromas. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2 B), 164–166. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.146>
- Trobiani, L., Meringolo, M., Diamanti, T., Bourne, Y., Marchot, P., Martella, G., Dini, L., Pisani, A., de Jaco, A., & Bonsi, P. (2020). The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 119, 37–51. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2020.09.017>
- Troca-Marín, J. A., Alves-Sampaio, A., & Montesinos, M. L. (2012). Deregulated mTOR-mediated translation in intellectual disability. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 96, Issue 2, pp. 268–282). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.01.005>
- Tromp, A., Mowry, B., & Giacomotto, J. (2020). Neurexins in autism and schizophrenia—a review of patient mutations, mouse models and potential future directions. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 26, Issue 3, pp. 747–760). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00944-8>

- Trotman, M., Barad, Z., Guévremont, D., Williams, J., & Leitch, B. (2014). Changes in the GRIP 1&2 scaffolding proteins in the cerebellum of the ataxic stargazer mouse. *Brain Research, 1546*, 53–62. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2013.12.027>
- van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J., Burley, M., Jeremiah, S., Woodward, K., Nahmias, J., Fox, M., Ekong, R., Osborne, J., Wolfe, J., Povey, S., ... Kwiatkowski, D. J. (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science, 277*(5327), 805–808. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.805>
- Vann, S. D., Brown, M. W., Erichsen, J. T., & Aggleton, J. P. (2000). Fos Imaging Reveals Differential Patterns of Hippocampal and Parahippocampal Subfield Activation in Rats in Response to Different Spatial Memory Tests. *Journal of Neuroscience, 20*(7), 2711–2718. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02711.2000>
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T. C., & Brose, N. (2006). Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron, 51*(6), 741–754. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.09.003>
- Varoqueaux, F., Jamain, S., & Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology, 83*(9), 449–456. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00410>
- Vogt, Priv.-Doz. Dr., H. (1908). Zur Pathologie und pathologischen Anatomie der verschiedenen Idiotieformen. pp. 106–117. *European Neurology, 24*(2), 106–117. <https://doi.org/10.1159/000211721>
- VOLKMAR, F. R., & NELSON, D. S. (1990). Seizure Disorders in Autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 29*(1), 127–129. <https://doi.org/10.1097/00004583-199001000-00020>
- von der Brelie, C., Waltereit, R., Zhang, L., Beck, H., & Kirschstein, T. (2006). Impaired synaptic plasticity in a rat model of tuberous sclerosis. *European Journal of Neuroscience, 23*(3), 686–692. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04594.x>
- von Manteuffel, S. R., Gingras, A. C., Ming, X. F., Sonenberg, N., & Thomas, G. (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93*(9), 4076–4080. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4076>

- Walf, A. A., Koonce, C., Manley, K., & Frye, C. A. (2009). Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behavioural Brain Research*, *196*(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.016>
- Waltereit, R., Welzl, H., Dichgans, J., Lipp, H.-P., Schmidt, W. J., & Weller, M. (2006). Enhanced episodic-like memory and kindling epilepsy in a rat model of tuberous sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *96*(2), 407–413. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03538.x>
- Wang, T., Guo, H., Xiong, B., Stessman, H. A. F., Wu, H., Coe, B. P., Turner, T. N., Liu, Y., Zhao, W., Hoekzema, K., Vives, L., Xia, L., Tang, M., Ou, J., Chen, B., Shen, Y., Xun, G., Long, M., Lin, J., ... Eichler, E. E. (2016). De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nature Communications* *2016* *7:1*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13316>
- Wang, Y., MacDonald, R. G., Thinakaran, G., & Kar, S. (2016). Insulin-Like Growth Factor-II/Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* *2016* *54:4*, *54*(4), 2636–2658. <https://doi.org/10.1007/S12035-016-9849-7>
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 32, Issue 5, pp. 1055–1070). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>
- Wortmann, S. B., Reimer, A., Creemers, J. W. T., & Mullaart, R. A. (2008). Prenatal diagnosis of cerebral lesions in Tuberous sclerosis complex (TSC). Case report and review of the literature. *European Journal of Paediatric Neurology*, *12*(2), 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2007.06.006>
- Yeung, R. S., Katsetos, C. D., & Klein-Szanto, A. (1997). Subependymal astrocytic hamartomas in the Eker rat model of tuberous sclerosis. *American Journal of Pathology*, *151*(5), 1477–1486. [/pmc/articles/PMC1858083/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11858083/)
- Yu, X. W., Pandey, K., Katzman, A. C., & Alberini, C. M. (2020a). A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *ELife*, *9*, 1–25. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54781>
- Yu, X. W., Pandey, K., Katzman, A. C., & Alberini, C. M. (2020b). A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *ELife*, *9*, 1–25. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54781>

- Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2015). MTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(52), 15790–15797. https://doi.org/10.1073/PNAS.1521919112/SUPPL_FILE/PNAS.1521919112.SAPP.PDF
- Zhou, J., & Parada, L. F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 22, Issue 5, pp. 873–879). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.05.004>
- Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(3), a009886. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886>
- Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2011). MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 21–35). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Physiology*, *64*(1), 355–405. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Name: Krummeich, Jennifer

Geburtsort:

Matrikelnummer:

Hiermit versichere ich, Jennifer Krummeich, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „mTOR-Dysregulation bei monogenen Syndromen: Entwicklung von Autismus und Störung der Gedächtniskonsolidierung in einem Mausmodell für Tuberöse Sklerose“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen wurden, sind in jedem Fall unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht oder in anderer Form als Prüfungsleistung vorgelegt worden.

Ort, Datum

Unterschrift