

# Identifizierung neuer Zielgene des mTOR- Signalwegs in Neuronen

## 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: Martin Schüle

geboren am: 15.04.1985

Matrikelnummer: 2666793

Mainz, April 2021

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>11</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>12</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>18</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Cortex.....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Evolutionäre Entwicklung des zerebralen Cortex .....	19
1.1.2 Corticogenese.....	20
<b>1.2 mTOR Signalweg .....</b>	<b>25</b>
1.2.1 mTOR – Proteinkomplex und Interaktionspartner .....	25
1.2.2 mTOR Inhibitoren.....	26
1.2.3 mTOR – upstream and downstream .....	27
1.2.4 mTOR – Funktionen im Gehirn.....	30
1.2.5 mTORopathien.....	32
<b>1.3 N-Cadherin .....</b>	<b>35</b>
1.3.1 N-Cadherin und mTOR .....	37
<b>1.4 Unmittelbar frühe Gene .....</b>	<b>38</b>
<b>1.5 Cholesterin.....</b>	<b>41</b>
<b>1.6 mTOR – Rolle in der Cholesterinbiosynthese.....</b>	<b>42</b>
<b>1.7 Hypothese/ Ziel dieser Arbeit .....</b>	<b>44</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>46</b>

<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>55</b>
2.2.1	Zellkultur .....	55
2.2.1.1	Kultivierung von Zelllinien .....	55
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	55
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahlen .....	55
2.2.1.4	Kultivierung von primären Neuronen.....	56
2.2.1.4.1	Beschichtung der Platten.....	56
2.2.1.4.2	Vorbereitungen zur Präparation der Maus .....	56
2.2.1.4.3	Durchführung der Mauspräparation.....	57
2.2.1.4.4	Isolierung der Neuronen.....	57
2.2.1.5	Behandlung mit pharmakologischen Stoffen.....	58
2.2.1.5.1	Behandlung der Neurone.....	58
2.2.1.5.2	IP-Injektionen.....	58
2.2.1.6	Transfektion von HeLa-Zellen.....	59
2.2.1.7	Transfektion von primären Neuronen.....	59
2.2.2	Isolierung der Proteine aus Zellen .....	59
2.2.3	Isolierung der Proteine aus Gewebe .....	60
2.2.4	Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen.....	60
2.2.5	Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe.....	61
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und RNA .....	62
2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
2.2.8	Western Blot .....	63
2.2.9	Reverse Transkription der mRNA .....	65
2.2.10	Quantifizierung der cDNA mittels quantitativer PCR (qPCR).....	65
2.2.11	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)-qPCR .....	67
2.2.12	RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) .....	68
2.2.12.1	Library .....	68
2.2.12.2	Sequenzierung.....	70
2.2.13	Assay for Transposase-Accessible Chromatin-Sequencing (ATAC-Seq)..	70
2.2.14	Cholesterol Assay .....	72
2.2.15	Luciferase Assay .....	72
2.2.16	3' Rapid amplification of cDNA-ends (3'RACE) .....	74
2.2.17	Immunfärbung .....	77
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivierung von primären Neuronen .....</b>	<b>79</b>
<b>3.2</b>	<b>Überprüfung der Differenzierung der primären Neuronen .....</b>	<b>80</b>

<b>3.3 Kandidatenansatz – N-Cadherin</b> .....	<b>80</b>
3.3.1 Expressionsmuster von N-Cadherin .....	81
3.3.2 Vitalität der primären Neuronen nach Temsirolimus-Behandlung.....	83
3.3.3 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von N-Cadherin – Stabilitätsexperimente.....	84
3.3.4 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von N-Cadherin – Posttranskriptionelle Regulation.....	86
<b>3.4 Identifizierung von mTOR-regulierten Genen in Neuronen (Hypothese- freier Ansatz)</b> .....	<b>89</b>
3.4.1 RNA Sequenzierung (RNA-seq) .....	89
3.4.2 mTOR reguliert die Expression der unmittelbar-frühen Gene in Neuronen ..	92
3.4.2.1 Validierung der Hochregulation unmittelbar früher Gene.....	92
3.4.2.2 Unmittelbar-frühe Gene werden 4 Stunden nach TS-Behandlung hochreguliert .....	93
3.4.2.3 Zusammenhang mit Genen, die nach neuronaler Aktivität angeregt werden .....	94
3.4.2.4 mTOR-Inhibierung induziert die Expression der IEGs auf Proteinebene.....	96
3.4.2.5 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation der IEGs.....	98
3.4.2.6 Evaluierung der Expression der IEGs <i>in vivo</i> .....	101
3.4.3 mTOR-Aktivität reguliert die Expression zahlreicher Gene des Cholesterinbiosynthesewegs in Neuronen und im sich entwickelnden zerebralen Cortex .....	106
3.4.3.1 Validierung der Herunterregulation der Metabolismus-Gene .....	106
3.4.3.2 mTOR-Inhibition vermindert die Expression von Metabolismogenen auf Proteinebene .....	106
3.4.3.3 Vergleich zu bereits publizierten Daten.....	107
3.4.3.4 Expressionsmuster von Genen des Cholesterin-Stoffwechsels und der Glykolyse .....	108
3.4.3.5 Die Aktivierung von mTOR erhöht die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene .....	111
3.4.3.6 mTOR reguliert die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene <i>in vivo</i> im sich entwickelnden zerebralen Cortex .....	112
3.4.3.7 mTOR-Inhibition hemmt die Cholesterin-Synthese in primären Neuronen.....	117
3.4.3.8 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von Genen des Cholesterin-Stoffwechsels .....	119

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>126</b>
<b>4.1</b>	<b>mTOR-abhängige Regulation von N-Cadherin .....</b>	<b>126</b>
<b>4.2</b>	<b>Änderungen des Transkriptoms nach mTOR Inhibition .....</b>	<b>129</b>
4.2.1	Verstärkte Expression von IEGs nach der Inhibition von mTOR .....	130
4.2.2	Expressionsmuster nach mTOR-Inhibition ähnlich einer neuronalen Aktivität.....	132
4.2.3	Keine Bestätigung der erhöhten IEG-Expression <i>in vivo</i> .....	133
4.2.4	mTOR reguliert spezifische bioenergetische zelluläre Prozesse .....	134
4.2.5	mTOR reguliert die Cholesterinbiosynthese in primären Neuronen .....	137
4.2.6	Regulation der Cholesterin-Gene durch mTOR .....	138
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>142</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>160</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entwicklung der verschiedenen Bereiche des Gehirns .....	21
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung des embryonalen Neocortex	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung der mTOR-Komplexe. ....	26
Abbildung 4: Hauptkomponenten des mTOR-Signalwegs. ....	29
Abbildung 5: Funktionsstörung der Zellsignale bei genetischen Erkrankungen mit veränderter mTOR-Aktivität.....	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Mechanismus des Zell-Zell Kontakts zweier Zellen über eine Adherens Junction durch N-Cadherin. ....	35
Abbildung 7: Aufbau der Western-Blot-Kammer und der verwendete Längenstandard. .....	64
Abbildung 8: Biolumineszenzreaktionen.....	73
Abbildung 9: Alternative Polyadenylierungsstellen (pA = polyadenylation sites) eines Gens. ....	75
Abbildung 10: Kultivierung von primären Neuronen der Maus aus dem zerebralen Neocortex. ....	79
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression von GFAP und $\beta$ - III-Tubulin in primären Neuronen der Maus. ....	80
Abbildung 12: Quantifizierung der Proteinexpression von N-Cadherin, pS6, S6 und GAPDH in primären Neuronen (DIV7).....	81
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression von N-Cadherin in primären Neuronen der Maus nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus (TS). ....	82
Abbildung 14: Quantifizierung der mRNA-Expression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für 24 Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.....	83
Abbildung 15: Analyse der primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus (je 24 Stunden) und Anfärbung mit MAP2, Tau und N- Cadherin. ....	84
Abbildung 16: Quantifizierung der Proteinexpression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Cycloheximid in primären Neuronen (DIV7).....	85
Abbildung 17: Quantifizierung der mRNA-Expression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Actinomycin D in primären Neuronen (DIV7).....	86
Abbildung 18: Schematische Abbildung der verwendeten Ncad-Konstrukte: Ncad UTR short, Ncad UTRlong delPolyA und Ncad UTR long. ....	87

Abbildung 19: Analyse der Expression unterschiedlicher 3'UTRs von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus für 24 Stunden mittels Luciferase Assay.....	87
Abbildung 20: Expression der 3'UTRs von N-Cadherin nach der Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden.....	88
Abbildung 21: Auswertung der RNA-Sequenzierung.....	90
Abbildung 22: Heat-Map der fehlregulierten Gene.....	91
Abbildung 23: Quantifizierung der mRNA-Expression von Fosb, cFos, Egr4, Npas4 und Junb nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel. ....	92
Abbildung 24: Zeitverlauf-Analyse der RNA-Expression der beiden Gene Fosb und Egr4 nach mTOR-Inhibition mittels qPCR.....	93
Abbildung 25: Zeitverlauf-Analyse der RNA-Expression der beiden Gene cFos und Fosb nach mTOR-Inhibition mittels qPCR.....	94
Abbildung 26: Venn-Diagramm über die Gene, die nach einer fünfstündigen Behandlung mit Temsirolimus hochreguliert vorliegen und Gene, welche nach neuronaler Aktivität induziert werden .....	95
Abbildung 27: Quantifizierung der mRNA-Expression von Fosb und Egr4 nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Tetrodotoxin (TTX) in primären Neuronen (DIV7).....	96
Abbildung 28: Analyse der Expression von cFos nach einem Knockdown von cFos in primären Neuronen mittels Western Blot und qPCR.....	97
Abbildung 29: Analyse der Proteinexpression von cFos, Fosb, Npas4 und GAPDH in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden.....	98
Abbildung 30: Analyse der Proteinexpression von pMAPK und MAPK in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus.....	99
Abbildung 31: Analyse der Proteinexpression von pMAPK und MAPK in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit Temsirolimus respektive U0126 für drei Stunden.....	100
Abbildung 32: Analyse der mRNA-Expression von cFos primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit U0126, Temsirolimus oder Temsirolimus und U0126 für fünf Stunden mittels qPCR. ....	101
Abbildung 33: Quantifizierung der Proteinexpression von pS6 und S6 von Cortex-Proben der Embryonen 24 Stunden nach intraperitonealer Rapamycin-Injektion des Muttertiers (1 mg pro kg Körpergewicht). ....	102
Abbildung 34: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression der beiden IEGs cFos und Fosb <i>in vivo</i> nach einmaliger und dreimaliger intraperitonealer	

Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin in tragenden Mäusen (E16 beziehungsweise E14-E16).....	103
Abbildung 35: Quantifizierung der Proteinexpression von pS6 und S6 von Cortex-Proben der postnatalen Tiere im Stadium P3 24 Stunden nach intraperitonealer Rapamycin-Injektion (1 mg pro kg Körpergewicht) des Muttertiers. ....	104
Abbildung 36: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression der beiden IEGs cFos und Fosb <i>in vivo</i> nach einmaliger intraperitonealer Injektion an P2 und zweimaliger intraperitonealer Injektion an P2 und P4 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin in tragenden Mäusen.....	105
Abbildung 37: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr, Osc, Mvd, Nsdhl und Acss2 nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für 5 Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel .....	106
Abbildung 38: Analyse der Proteinexpression von Ldlr, Osc, Mvd, Nsdhl und GAPDH in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden.....	107
Abbildung 39: Venn-Diagramm über die herunterregulierten Gene nach mTOR-Inhibition und der durch mTOR Aktivierung hochregulierten Gene.....	108
Abbildung 40: Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges und der Glykolyse nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qPCR und Excel. ....	109
Abbildung 41: Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene der Glykolyse (Pfkf, Pgm2 und Pdk1) nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Torin 1 für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.....	110
Abbildung 42: Western Blot der primären Neuronen fünf Stunden nach DMSO, Temsirolimus beziehungsweise Torin1-Behandlung.....	110
Abbildung 43: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr und Dhcr7 nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise IGF-1 für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel. ....	111
Abbildung 44: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges nach intraperitonealer Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin für 24 Stunden in tragenden Mäusen (E16).....	112
Abbildung 45: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges nach intraperitonealer Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht) an drei aufeinanderfolgenden Tagen in tragenden Mäusen (E14.5-E16.5). ....	114
Abbildung 46: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion	

im Stadium P2 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht). .....	115
Abbildung 47: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges 48 Stunden nach zweimaliger intraperitonealer Injektion in den Stadien P2 und P4 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht). .....	116
Abbildung 48: Schematische Übersicht des Cholesterinsynthesewegs in der Maus....	118
Abbildung 49: Veränderungen im Cholesteringehalt in primären Neuronen (DIV6) mittels Amplex Red Cholesterol Assay nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden oder Cyclodextrin (CD) für eine Stunde. ....	119
Abbildung 50: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr, Osc und Nsdhl nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Actinomycin D in primären Neuronen (DIV7).....	120
Abbildung 51: Veränderungen der Chromatin-Zugänglichkeit der Gene Ldlr, Osc und Nsdhl nach Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus für 24 Stunden mittels ATAC-seq .....	121
Abbildung 52: Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren in Neuronen nach mTOR-Inhibition. ....	122
Abbildung 53: Transkriptionsfaktoren, die Bindestellen in den herunterregulierten Genen aufweisen. ....	123
Abbildung 54: Subzelluläre Lokalisation von NF-YA in primären Neuronen.....	123
Abbildung 55: ChIP-qPCR Analyse der Bindung von NF-YA mit unterschiedlichen Genen nach mTOR-Inhibition. ....	124

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller. ....	46
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und ihre Hersteller. ....	47
Tabelle 3: Verwendete Kits und ihre Hersteller. ....	50
Tabelle 4: Verwendete Primer für qPCR. ....	51
Tabelle 5: Verwendete Primer für ChIP-qPCR. ....	52
Tabelle 6: Verwendete Primer für cDNA + PCR. ....	52
Tabelle 7: Verwendete Plasmide für Transfektionen. ....	53
Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller zur Immunfärbung von Zellen und Hirnschnitten. ....	53
Tabelle 9: Verwendete sekundäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller zur Immunfärbung von Zellen. ....	53
Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller für Western Blot und Immunpräzipitation. ....	54
Tabelle 11: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Kultivierung der primären Neuronen. ....	58
Tabelle 12: Zusammensetzung des Protein-Lyse-Puffers „Magic Mix“. ....	60
Tabelle 13: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der SDS-Page. ....	62
Tabelle 14: Zusammensetzung der verwendeten Gele bei der SDS-Page. ....	63
Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer beim Western Blot. ....	64
Tabelle 16: Bedingungen der cDNA-Synthese der Gesamt-RNA. ....	65
Tabelle 17: Bedingungen der qRT-PCR. ....	66
Tabelle 18: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Chromatin- Immunpräzipitation. ....	67
Tabelle 19: Thermocycler-Programm für qRT-PCR (RNA-Sequenzierung). ....	69
Tabelle 20: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der ATAC-Sequenzierung. .....	71
Tabelle 21: Thermocycler-Programm für PCR (ATAC-Sequenzierung). ....	71
Tabelle 22: Zusammensetzungen der eingesetzten Bestandteile beim Luciferase-Assay. .....	74
Tabelle 23: Thermocycler-Programm für PCR (3'RACE). ....	77
Tabelle 24: Zusammensetzung des LB-Mediums für die Bakterienkultur. ....	77
Tabelle 29: Verwendete Puffer bei der Immunfärbung. ....	78

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
4E-BP	eIF4E Binding Protein
A	Ampere
AML	<i>amyloid myeloid leukemia</i>
AMPK	<i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>Aktivatorprotein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	Cytosine-b-D-arabinofuranoside
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
aRG	apikale radiale Gliazelle
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factors</i>
bp	Basenpaare (DNA)
bRG	basale radiale Gliazellen
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Methyl-beta-Cyclodextrin
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cdh2	N-Cadherin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	Cortexplatte
CREB1	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
Cux2	<i>cut like homeobox 2</i>
DAPT	<i>N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester</i>
DCX	<i>doublecortin</i>
DEG	differenziell exprimiertes Gen
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
DIV	<i>days in vitro</i>

---

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
dT	<i>desoxythymidine</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-4	<i>early growth response 4</i>
Erk	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
etc.	et cetera
E-XY	<i>embryonic day XY</i>
FBS	Fetales Bovine Serum
FKBP12	<i>FK506 binding protein 12</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FRB	<i>FKBP-rapamycin-binding</i>
<i>FXR1</i>	<i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>
FXS	Fragile X-Syndrom
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histondeacetylase
HEAT	<i>Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
IEG	<i>immediate early gene</i>

---

IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IPC	<i>intermediate progenitor cells</i>
iSVZ	innere subventrikuläre Zone
IZ	intermediäre Zone
kDa	Kilodalton
KLF4	<i>krueppel-like factor 4</i>
LTP	Langzeitpotenzierung
l	Liter
IP	intermediäre Vorläuferzellen
IZ	intermediäre Zone
Ldlr	<i>low density lipoprotein receptor</i>
Lis1	<i>lissencephaly gene 1</i>
M	Molar
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MEF2	<i>myocyte enhancer factor-2</i>
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
mg	Milligramm
mGluR	<i>metabotropic glutamate receptor</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLST8	<i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mSin1	<i>stress-activated map kinase interacting protein 1</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MyoD1	<i>Myoblast determination protein 1</i>
MZ	marginale Zone
N-Cad	neuronales Cadherin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NE	Neuroepithelium
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NF-Y	<i>nuclear factor-Y</i>
NF1	<i>neurofibromin 1</i>
ng	Nanogramm
nIPC	<i>neurogenic intermediate progenitor cell</i>

---

Npas4	<i>neuronal Per Arnt Sim domain-containing protein 4</i>
NPC	<i>Niemann-Pick disease type C</i>
NPC1	<i>NPC intracellular cholesterol transporter 1</i>
oSVZ	äußere subventrikuläre Zone
<i>Otx1</i>	<i>orthodenticle homeobox 1</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pax6	<i>paired box protein Pax-6</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline-Tween</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PDK1</i>	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
<i>PGC1<math>\alpha</math></i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
<i>Pgm2</i>	<i>Phosphoglucomutase 2</i>
Pip3	<i>phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFK	Phospho-Fructo-Kinase
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinases</i>
PKC $\alpha$	<i>protein kinase c alpha</i>
Poly-A	Poly-Adenin
PRAS40	<i>proline-rich protein</i>
PP	Präplatte
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
Ran-GTP	<i>Ras-related nuclear protein guanosine-5'-triphosphate</i>
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
REDD1	<i>regulated in development and DNA damage responses 1</i>
<i>Rheb</i>	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RGC	radiale Gliazellen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSK1	<i>ribosomal S6 kinase 1</i>
RT	Raumtemperatur
S6K1	p70S6 Kinase 1

---

SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
sog.	sogenannt
SP	Subplatte
SP1	<i>specific protein 1</i>
SQLE	<i>squalene epoxidase</i>
SREBP	<i>sterol responsive element binding protein</i>
SVZ	subventriculäre Zone
Tel2	telomere length regulation protein 2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TS	Temsirolimus
TSC	Tuberöse Sklerose Komplex
TOR-KI	mTOR-Kinase-Inhibitoren
Txnip	<i>thioredoxin-interacting protein</i>
Tti	<i>TELO2 interacting protein</i>
undiff.	undifferenziert
ULK1	<i>unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
VZ	ventriculäre Zone
YY1	<i>yin yang 1</i>

## Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass eine Dysregulation von mTOR zur Entwicklung und zum Fortschreiten von Krankheiten beiträgt. Zu diesen Krankheiten gehören verschiedene neurologische Entwicklungsstörungen wie geistige Behinderung (ID), Autismus-Spektrum-Störung (ASD) oder auch Epilepsie. Folgen einer mTOR-Dysregulation auf molekularer und zellulärer Ebene sind aber weitgehend unbekannt. So ist beispielsweise bekannt, dass eine fehlerhafte Funktion von mTOR lokal in Synapsen und Dendriten die Proteinbiosynthese beeinträchtigt, bestimmte Zielgene wurden bisher aber kaum identifiziert. Die Identifizierung von Zielgenen und weiteren Mechanismen ist wichtig für das Verständnis der neuronalen mTOR-Funktion sowie der Pathogenese von neurologischen Entwicklungsstörungen, welche mit Änderungen der mTOR-Aktivität verbunden sind.

N-Cadherin gilt als vielversprechender Kandidat für die erwähnte mTOR-vermittelte lokale mRNA-Translation. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher das Expressionsmuster dieses Zelladhäsionsmoleküls nach Inhibition des mTOR-Signalwegs mittels des mTOR-Inhibitor Temsirolimus untersucht. Nach einer bestätigten reduzierten Änderung der Expression von N-Cadherin in primären, corticalen Mausneuronen, wurde bei der Regulation von N-Cadherin durch mTOR vor allem eine mögliche posttranskriptionelle Regulation über den 3'UTR von N-Cadherin untersucht.

Anhand eines hypothesefreien Ansatzes wurde versucht weitere Zielgene von mTOR in primären Neuronen zu identifizieren. Mittels RNA-Sequenzierung wurde das Transkriptom in primären Neuronen nach mTOR-Inhibition untersucht. Hierbei zeigte sich vor allem eine reduzierte Expression von Genen, die mit der Synthese oder dem Transport von Cholesterin einhergehen. In der Folge wurde eine reduzierte Proteinexpression dieser Gene bestätigt. Abschließend konnte gezeigt werden, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im sich entwickelnden Cortex der Maus eine reduzierte Cholesterinsynthese nach der Inhibition von mTOR vorliegt. Eine durch fehlerhafte mTOR-Aktivität verursachte Fehlregulation der Biosynthese von Cholesterin im Gehirn könnte teilweise für die Progression neuronaler Erkrankungen während der Embryonalentwicklung verantwortlich sein.

## Abstract

It is believed that dysregulation of mTOR contributes to the development and progression of diseases. These diseases include various neurodevelopmental disorders such as intellectual disability (ID), autism spectrum disorder (ASD) or epilepsy. However, the consequences of mTOR dysregulation at the molecular and cellular level are largely unknown. It is known, for example, that a deficient function of mTOR locally at synapses and dendrites impairs protein synthesis, but certain target genes have hardly been identified so far. The identification of target genes and other mechanisms is important for understanding neural mTOR function and the pathogenesis of neurodevelopmental disorders associated with changes in mTOR activity.

N-cadherin is considered to be a promising candidate for the mentioned mTOR-mediated local mRNA translation. In the first part of this work, the expression pattern of this cell adhesion molecule after inhibition of the mTOR signaling pathway using the mTOR inhibitor temsirolimus was examined. After a confirmed reduced change in the expression of N-cadherin in primary cortical mouse neurons, a possible post-transcriptional regulation via the 3'UTR of N-cadherin was examined for the regulation of N-cadherin by mTOR.

Using a hypothesis-free approach, an attempt was made to identify further target genes of mTOR in primary neurons. The transcriptome in primary neurons after mTOR inhibition was examined by means of RNA sequencing. Above all, there was a reduced expression of genes associated with the synthesis or transport of cholesterol. As a result, a reduced protein expression of these genes was confirmed. Finally, it could be shown that both *in vitro* and *in vivo* a reduced cholesterol synthesis is present in the developing cortex of the mouse after the inhibition of mTOR. A dysregulation of the biosynthesis of cholesterol in the brain caused by defective mTOR activity could be partly responsible for the progression of neuronal diseases during embryonic development.

# 1 Einleitung

## 1.1 Cortex

### 1.1.1 Evolutionäre Entwicklung des zerebralen Cortex

Die Großhirnrinde (Cortex) spielt eine zentrale Rolle bei der kognitiven und emotionalen Verarbeitung. Der Cortex beherbergt all jene Areale, die für die höheren Funktionen verantwortlich sind, wie das Sprachverständnis, die Sprachfähigkeit, komplexe kognitive Leistungen, emotionale Funktionen und Persönlichkeit. Makroskopisch lässt sich der Cortex in verschiedene Bereiche gliedern. Hierbei gibt es Einteilung in vier Hauptlappen (Lobi), welche durch tiefere Spalten (Fissurae) voneinander getrennt sind. Diese Lappen lassen sich sowohl morphologisch als auch funktionell untergliedern. Der Frontallappen ist hierbei vor allem für motorische Bewegungen, für die Handlungsplanung und -initiierung sowie für die Persönlichkeitsbildung zuständig. Der Parietallappen dient sowohl der somatosensorischen Funktion als auch dem räumlichen Denken. Der Occipitallappen als Teil des visuellen Systems verarbeitet die visuellen Impulse und gilt daher als Sehzentrum des Gehirns, während der Temporallappen beim Hören, dem Verstehen und der Gedächtnisbildung beteiligt ist. Störungen in der Architektur des Cortex beim Menschen können unter anderem zu geistigen Entwicklungsstörungen und Epilepsie führen (Gleeson & Walsh, 2000).

Daher ist das Verständnis der Mechanismen, die seine Entwicklung und Funktion steuern, von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Grundlagen schwerer Neuroentwicklungsstörungen und neuropsychiatrischer Erkrankungen, insbesondere derjenigen, die zum ersten Mal in der Kindheit auftreten.

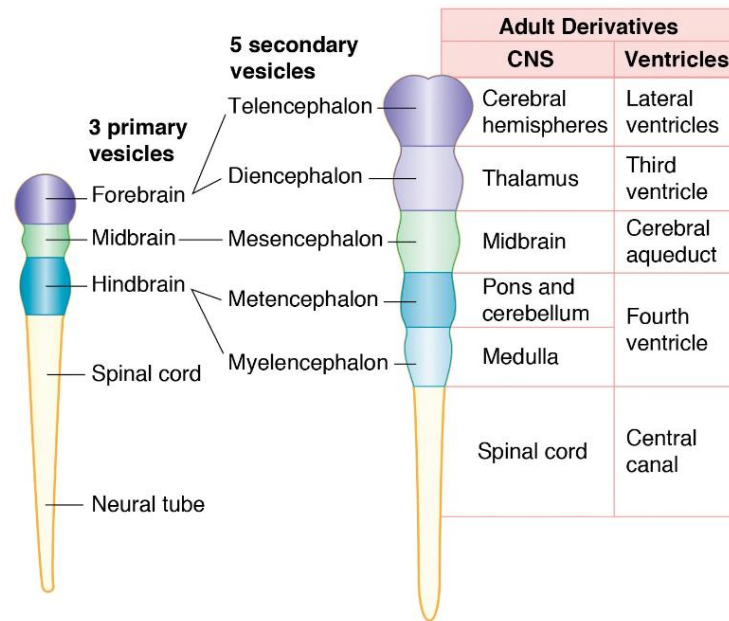
Die Entwicklung des zerebralen Cortex bei Säugetieren wird als ein entscheidender evolutionärer Fortschritt angesehen, der eine höhere kognitive Funktion ermöglicht. Cortices verschiedener Säugetierarten variieren jedoch stark in Form, Größe und Neuronenzahl (Herculano-Houzel, 2009). Diese Unterschiede sind vermutlich auf Unterschiede in der Organisation und dem Verhalten neuronaler Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung zurückzuführen. Neuere Modelle der embryonalen Cortex-Entwicklung basieren größtenteils auf zellulären und molekularen Studien an Maus und Ratte, deren Cortex viele der für alle Säugetiere allgemeinen Schlüsselmerkmale aufweist. Hierzu gehören eine sechsschichtige Organisation und Regionalisierung in

sensorische, motorische und Assoziationsbereiche. Da der Cortex von Mäusen jedoch nicht gefaltet (sondern lissenzephal) vorliegt, ist seine Fähigkeit, die Entwicklungsmechanismen eines größeren und stark gefalteten (gyrencephalen) Cortex wie den des Homo sapiens zu modellieren von Natur aus begrenzt.

### **1.1.2 Corticogenese**

Die Corticogenese beschreibt den Prozess, bei dem der zerebrale Cortex des Gehirns während der Entwicklung des Nervensystems gebildet wird. Der Cortex ist die äußere Schicht des Gehirns und besteht aus bis zu sechs Schichten (Layers). Der Prozess der Corticogenese findet vom embryonalen Tag 10 bis 17 bei Mäusen und zwischen den Schwangerschaftswochen 7 und 18 beim Menschen statt.

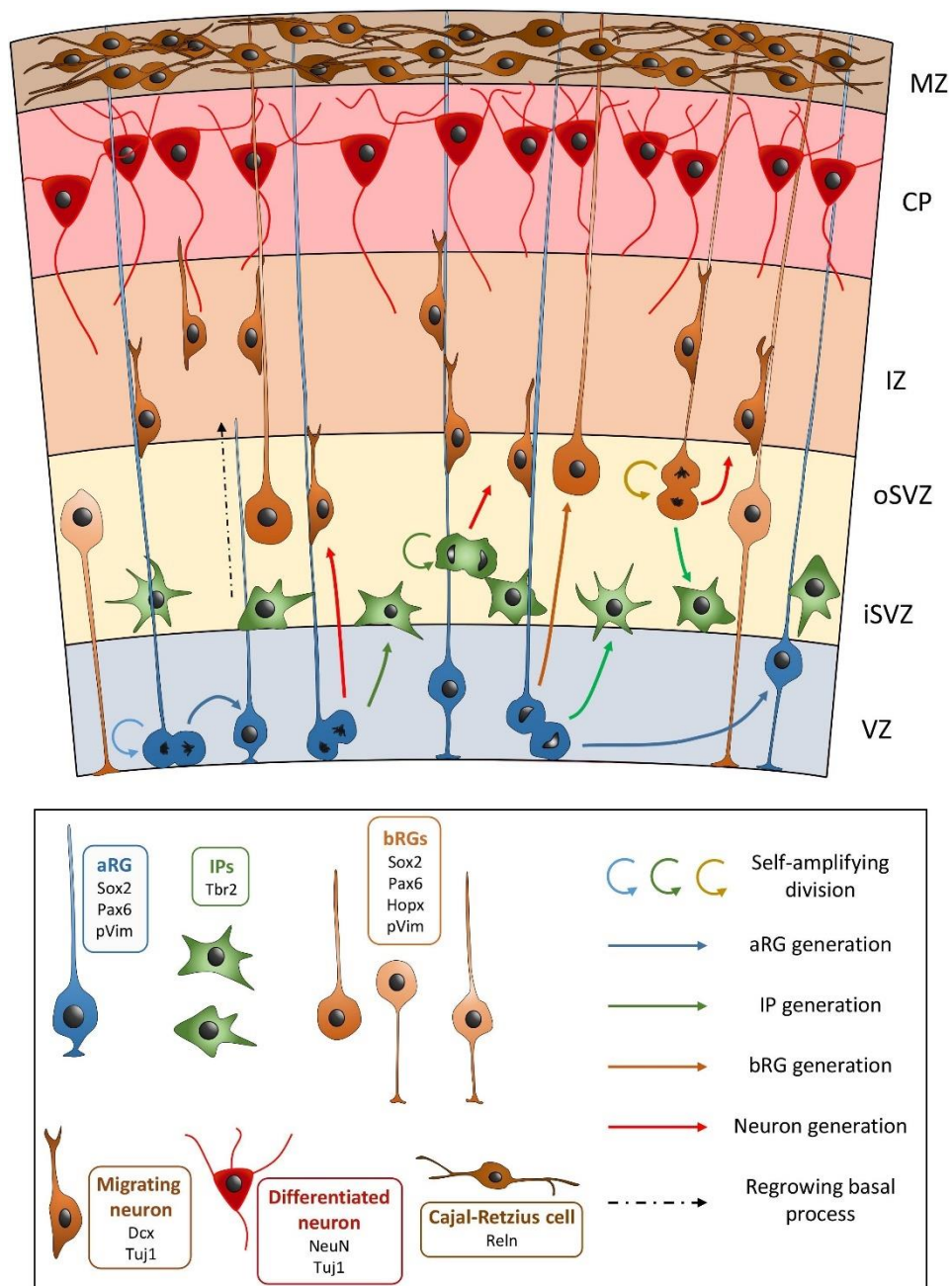
Im Folgenden wird auf die Entwicklung des zerebralen Cortex des Wirbeltiergehirns Bezug genommen. Nach der Befruchtung der Eizelle entwickeln sich im Embryo die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus einem Teil des Ektoderms, dem Neuroektoderm, bildet sich die Neuralplatte, aus der der größte Anteil des Nervensystems entsteht. Aus der Neuralplatte wiederum entsteht nach Absenkung und Schließung das Neuralrohr, was als Neurulation bezeichnet wird. Nach dem Verschluss des Neuralrohrs entwickelt sich daraus das Ventrikelsystem. Während aus dem kaudalen Abschnitt des Neuralrohrs das Rückenmark entsteht, entwickelt sich der rostrale Abschnitt zu den primären Hirnvesikeln, die als Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Rhombencephalon (Hinterhirn) bezeichnet werden. Sekundär entstehen daraus fünf Hirnbläschen: Telencephalon (Großhirn), Diencephalon (Zwischenhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Metencephalon (Kleinhirn) und das Myelencephalon (Markhirn). Aus dem ventralen Bereich des Telencephalons entwickelt sich das Subpallium, aus dem die Basalganglien entstehen, welche an der Prozessierung von motorischen und komplex-integrativen Handlungsmustern beteiligt sind. Aus dem dorsalen Teil des Telencephalons bildet sich das Pallium, aus dem sich der zerebrale Cortex mit seinen Subdomänen Neocortex, Archicortex und Paläocortex entwickelt. Eine Übersicht der Entwicklung der verschiedenen Bereiche des Gehirns aus den primären und sekundären Hirnbläschen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Die Entwicklung der verschiedenen Bereiche des Gehirns** aus den primären Bläschen, über die sekundären Bläschen zu den endgültigen Hirnbereichen beim erwachsenen Menschen. Quelle: [www.basicmedicalkey.com](http://www.basicmedicalkey.com)

Während der embryonalen Entwicklung wird der zerebrale Cortex in einer sechsschichtigen Anordnung organisiert (Rakic, 1974). Jede dieser Schichten besitzt ihre eigenen funktionellen Eigenschaften. Störungen dieser Eigenschaften können zu unterschiedlichen Erkrankungen wie z.B. Intelligenzminderung oder Bewegungsstörungen führen (Olson & Walsh, 2002). Die Entwicklung des Cortex beginnt mit der Proliferation neuroepithelialer Zellen im dorso-lateralen Bereich des Neuralrohrs (Malatesta et al., 2003). Diese Zellschicht wird als ventrikuläre Zone (VZ) bezeichnet. Die ersten Projektionsneuronen, welche die ventrikuläre Zone radial migrierend verlassen, bilden die Präplatte (PP), welche sich zwischen der Pia mater und der ventrikulären Zone befindet und sich später in eine basal liegende marginale Zone (MZ) und die Subplatte (SP) teilt. Die marginale Zone enthält hierbei hauptsächlich Cajal-Retzius-Zellen. Dieses nur vorübergehend existente Neuron spielt durch die Bildung des Proteins Reelin eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung der Cortexschichten sowie der Schichtung hippocampaler Projektionen (Rice & Curran, 2001). Radiale Gliazellen gehören zu den ersten Zellen, die sich in der ventrikulären Zone des sich entwickelnden Cortex differenzieren. Ihre langen Fortsätze wachsen radial, also senkrecht zur Orientierung der Ventrikeloberfläche nach außen. Diese radialen Gliazellen bringen sowohl pyramidale Neurone als auch Gliazellen hervor (Anthony et al., 2004). Die radialen Gliazellen oder auch neurale Stammzellen teilen sich entweder asymmetrisch in

eine neue radiale Gliazelle sowie ein postmitotisches Neuron, oder eine intermediäre Vorläuferzelle, oder symmetrisch in zwei intermediäre Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen teilen sich wiederum symmetrisch entweder in Neurone oder in weitere Vorläuferzellen (Haubensak et al., 2004). Des Weiteren stellen die radialen Gliazellen durch ihre radialen Fortsätze das Gerüst bereit, an dem postmitotische Zellen entlangwandern können, um letztendlich in die gewünschte Position im Cortex zu migrieren (Rakic, 1972). Im Anschluss bildet sich zwischen der marginalen Zone und der Subplatte die Cortexplatte (CP), welche die embryonale Anlage des mehrschichtigen Cortex darstellt. Diese Mehrschichtigkeit entsteht nach dem inside-out-Prinzip. Frühe autoradiographische Thymidin-Studien bei Primaten und Nagetieren ergaben, dass sich radial wandernde Neurone in der Cortexplatte von außen nach innen festsetzen (Angevine & Sidman, 1961). Die am frühesten geborenen Neuronen sind dazu bestimmt, die zukünftige Schicht 6 nahe an der ventrikulären Zone zu werden, während sich die zuletzt geborenen Neuronen zur Schicht 2 nahe der Marginalzone entwickeln. Der Aufbau des Cortexes mit den verschiedenen Zonen, die Wanderung der Neuronen entlang der radialen Gliazellen, sowie eine Darstellung der verschiedenen Zellteilungswege der radialen Gliazellen sind in der folgenden Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung des embryonalen Neocortex.** VZ, ventrikuläre Zone; iSVZ, innere subventrikuläre Zone; oSVZ, äußere subventrikuläre Zone; IZ, intermediäre Zone; CP, Cortexplatte; MZ, marginale Zone. aRG, apikale radiale Gliazelle; bRGs, basale radiale Gliazellen (verschiedene bRG-Morphotypen sind gezeigt); IP, intermediärer Vorläuferzellen. In der Legende werden gemeinsame genetische Marker für jeden Zelltyp angegeben. Quelle: Penisson et al., 2019

Der menschliche Cortex ist im Vergleich zur Maus - dem in der Forschung verwendeten dominanten Modellorganismus - mit einer mehr als 1000-fach größeren Fläche und Anzahl von Neuronen erweitert (Herculano-Houzel et al., 2006). Während die allgemeinen Prinzipien der corticalen Entwicklung und der Grundarchitektur des Cortex bei Säugetieren erhalten zu bleiben scheinen (DeFelipe, 2011), deuten frühere Studien auf Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des menschlichen Cortex hin.

Beispielsweise werden oberflächliche corticale Schichten in der Säugetierentwicklung erweitert (Hill & Walsh, 2005), und einige Zelltypen, wie interlaminaire Astrozyten (Oberheim et al., 2009) und Hagebuttenneuronen (Boldog et al., 2018), weisen beim Menschen im Vergleich zur Maus spezielle Merkmale auf. Ebenso variiert die Transkriptionsregulation zwischen Maus und Mensch, einschließlich der Transkription von Genen, die mit der neuronalen Struktur und Funktion assoziiert sind (Hawrylycz et al., 2015).

Durch die Charakterisierung zahlreicher Gene, welche am Prozess der radialen Migration beteiligt sind, konnte die Entstehung von Fehlbildungen des Cortex beim Menschen besser verstanden werden. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen der Gene *REELER*, *LIS1* (*lissencephaly gene 1*) und *DCX* (*doublecortin*) zu einem fehlerhaft geschichteten Cortex beim Menschen führen (Ogawa et al., 1995; Reiner et al., 1993). Mutationen oder Deletionen der Gene *Lis1* und *Dcx* führen beispielsweise zu einer unzureichenden neuronalen Migration aufgrund fehlerhafter Interaktion der Gene mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Zerebrale Fehlbildungen, welche durch Migrationsstörungen hervorgerufen werden und durch eine glatte Gehirnoberfläche charakterisiert sind, gelten als Lissenzephalien. Hierbei kommt es unter anderem zu motorischen Dysfunktionen wie Epilepsien oder Schluckstörungen (Ross & Dobyns, 2001).

Es gibt zwei Haupttypen von corticalen Neuronen, welche für die kognitiven Leistungen im zerebralen Cortex eine wichtige Rolle spielen. Etwa 80% sind Projektionsneuronen. Dabei handelt es sich um exzitatorische Zellen, die Glutamat als Neurotransmitter verwenden. Ihr Axon erstreckt sich intra- und subcortical über weite Strecken zu seinen synaptischen Zielen. Bei den restlichen 20 % handelt es sich um lokale Schaltkreisneurone (Interneurone). Diese inhibitorischen Zellen verwenden GABA als ihren Neurotransmitter. Verschiedene Transkriptionsfaktoren und der Zeitpunkt der Geburt der Zellen entscheidet über den Zielort der Migration und damit über den endgültigen Zelltyp. So exprimieren die Vorläuferzellen von Neuronen in der ventrikulären Zone beispielsweise den Transkriptionsfaktor *Pax6* (*paired box protein Pax-6*), während die Zellen der subventrikulären Zone *Cux2* (*cut like homeobox 2*) exprimieren (Tarabykin, 2001).

Störungen der Entwicklung und Entfaltung der Projektions- und Interneurone können zu einer fehlerhaften Bildung corticaler Schaltkreise und damit einhergehend zu einer

Dysregulation des Gehirnwachstums führen. Hierbei kommt es zu Funktionsstörungen in der sozialen und emotionalen Kommunikation, Sprache und Kognition (Courchesne & Pierce, 2005).

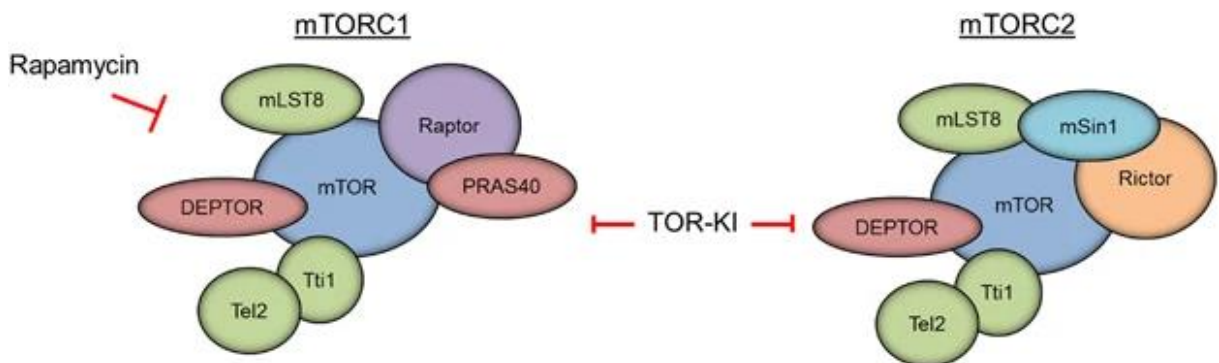
## 1.2 mTOR Signalweg

Der *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg ist einer der Hauptregulatoren bei der Proteinsynthese und des Zellwachstums. Der mTOR-Signalweg wird als Reaktion auf Nährstoffe (Aminosäuren), Wachstumsfaktoren (Insulin, *IGF-1*) und zelluläre Energie (ATP) aktiviert (Wullschleger et al., 2006). Der mTOR-Signalweg gilt dabei als zentraler Regulator der Ribosomenbiogenese, Proteinsynthese und des Zellwachstums. Die Geschichte von mTOR begann mit der Entdeckung des antimykotischen Makrolids Rapamycin in den 1970er Jahren, welches vom Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus* produziert wurde. Der Name Rapamycin leitet sich vom Fundort, der Insel „Rapa Nui“ ab. Anfangs noch als Antimykotikum verwendet, wurde durch weitere Untersuchung des Moleküls eine immunsuppressive Wirkung nachgewiesen, welches nach Organtransplantationen oder Chemotherapie angewendet werden konnte. Durch Rapamycin wurde das damit verbundene Protein – mTOR – entdeckt (Sabatini et al., 1994).

### 1.2.1 mTOR – Proteinkomplex und Interaktionspartner

Bei mTOR handelt es sich um eine atypische Serin/Threonin-Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 290 kDa. Das mTOR-Protein selbst enthält mehrere strukturelle und funktionelle Domänen. In der aminoterminalen Hälfte findet sich eine Reihe von HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR) -Wiederholungen, welche für Proteininteraktionen wichtig sind. Bei der FRB (*FKBP-rapamycin-binding*) -Domäne, die sich in der Mitte des Proteins befindet, handelt es sich um die Bindedomäne für den FKBP12 (*FK506 binding protein 12*) -Rapamycin-Komplex, der die mTOR-Aktivität inhibiert (E. J. Brown et al., 1994). Die katalytische Einheit von mTOR befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins. Insgesamt ist das TOR-Protein von Hefen bis zu den Säugetieren sehr gut konserviert (Hall, 2008). Das mTOR-Protein befindet sich in zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Komplexen: mTORC1 und mTORC2. Kennzeichnend für mTORC1 ist das Protein Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), während in mTORC2 das Protein Rictor (*rapamycin-insensitive companion of*

*mTOR*) vorliegt. Darüber hinaus zeigt Abbildung 3 die unterschiedlichen Proteine, aus denen sich mTORC1 und mTORC2 zusammensetzen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der mTOR-Komplexe.** mTORC1 besteht aus der mTOR-Kinase, mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein), Tti (TEL2 interacting protein/Tel2 (telomere length regulation protein 2), Raptor und PRAS40 (proline-rich protein). mTORC2 teilt die mTOR-Kinase, mLST8, Tti/Tel2 und DEPTOR, enthält jedoch einzigartigen Komponenten Rictor und mSin1 (stress-activated map kinase interacting protein 1). Rapamycin ist ein bekannter allosterischer Inhibitor von mTORC1, während mTOR-Kinase-Inhibitoren (TOR-KIs) die Aktivitäten beider Komplexe hemmen (modifiziert nach *L. C. Kim et al., 2017*).

Lange Zeit wurde angenommen, dass mTORC2 gegenüber Rapamycin unempfindlich ist. Es konnte jedoch durch eine Langzeitbehandlung mit Rapamycin von mehr als 48 Stunden eine verminderte Aktivität von mTORC2 beobachtet werden (Sarbasov et al., 2006). Die Dissoziation von mTORC2 durch Rapamycin wird hierbei über die Dephosphorylierung von Rictor und mSin1 realisiert (Rosner & Hengstschläger, 2008).

## 1.2.2 mTOR Inhibitoren

Neben dem bekanntesten Inhibitor von mTOR existieren weitere Generationen von mTOR-Inhibitoren. Rapamycin wurde ursprünglich als Immunsuppressivum angewendet und wird seit etwa 20 Jahren für die Verhinderung von Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten verwendet. Rapamycin hemmt jedoch nicht direkt die katalytische Aktivität von mTOR. Infolgedessen werden nur manche Funktionen von mTORC1 inhibiert. Es wurde gezeigt, dass sich die Wirkung von Rapamycin auf die mTORC1-Aktivität auf schwächere Substrate wie die p70S6 Kinase 1 (S6K1) beschränkt, während eine Wirkung auf eIF4E Binding Protein (4E-BP) nur begrenzt existiert (Choo et al., 2008). Mit der Weiterentwicklung der Rapamycin-Analoga (Rapaloge), zu denen Temsirolimus und Everolimus gehören, wurde die Stabilität und die Wasserlöslichkeit gegenüber Rapamycin erhöht (Rini, 2008). Angesichts der Tatsache, dass Rapamycin und Temsirolimus nicht die komplette mTORC1-Aktivität hemmen, haben akademische und

pharmazeutische Laboratorien Präparate entwickelt, welche die katalytische Aktivität von mTOR inhibieren. Das bedeutet eine Wirkweise auf alle nachgeschalteten Zielproteine von mTORC1, aber auch auf die Aktivität von mTORC2. Dies führte zu einer zweiten Generation von mTOR-Inhibitoren wie Torin 1, die als ATP-kompetitive Wirkstoffe für mTOR fungieren.

### 1.2.3 mTOR – upstream and downstream

Um zu wachsen und sich zu teilen, müssen Zellen die Produktion von Proteinen, Lipiden und Nukleotiden steigern, während gleichzeitig katabole Prozesse wie Autophagie unterdrückt werden. mTORC1 spielt bei der Regulierung dieser Prozesse eine zentrale Rolle und steuert das Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus als Reaktion auf die Umgebungsbedingungen. mTORC1 fördert die Proteinsynthese weitgehend durch die Phosphorylierung der beiden Schlüsseffektoren p70S6 Kinase 1 (S6K1) und eIF4E Binding Protein (4EBP). S6K1 phosphoryliert und aktiviert hierbei mehrere Substrate, welche die Initiierung der mRNA-Translation fördern, wie beispielsweise eIF4B, das ein positiver Regulator des 5'-cap bindenden eIF4F-Komplexes ist (Holz et al., 2005). Das mTORC1-Substrat 4EBP hemmt die Translation durch Bindung von eIF4E, sodass der Aufbau des eIF4F-Komplexes verhindert wird. mTORC1 phosphoryliert 4EBP an verschiedenen Stellen, wodurch dessen Dissoziation von eIF4E ausgelöst wird und dadurch die 5'-cap-abhängige mRNA-Translation ermöglicht wird (Gingras et al., 1999).

mTORC1 fördert darüber hinaus die *de novo* Lipidsynthese durch die *sterol responsive element binding protein* (SREBP) Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren steuern die Expression verschiedener Stoffwechselfgene, die an der Biosynthese von Fettsäuren und Cholesterin beteiligt sind (Porstmann et al., 2008). Während SREBP als Reaktion auf niedrige Sterolspiegel aktiviert wird, kann SREBP auch unabhängig über mTORC1 sowohl über einen S6K1 abhängigen Mechanismus (Düvel et al., 2010) als auch über die Phosphorylierung des Substrats Lipin1, welches SREBP in Abwesenheit von mTORC1-Aktivität hemmt, aktiviert werden (Peterson et al., 2011).

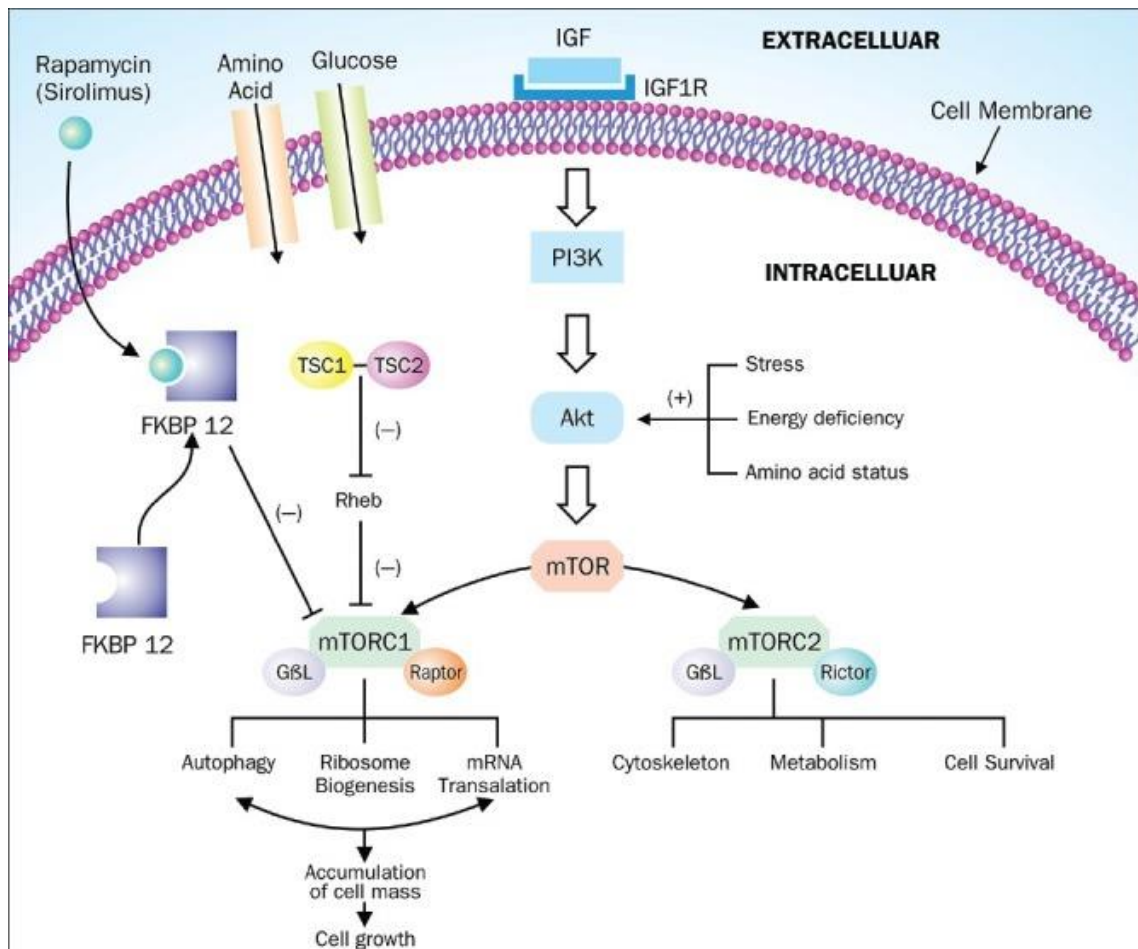
mTORC1 ermöglicht außerdem das Wachstum von Zellen, indem es eine Verschiebung des Glucosestoffwechsels von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Glykolyse fördert, wodurch der Einbau von Nährstoffen in neue Biomasse begünstigt wird. mTORC1 erhöht dabei die Translation des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible*

*factor 1-alpha* (HIF1 $\alpha$ ), welcher die Expression mehrerer glykolytischer Enzyme wie z.B. Phospho-Fructo-Kinase (PFK) steuert (Düvel et al., 2010).

Zusätzlich zu den verschiedenen anabolen Prozessen, fördert mTORC1 das Zellwachstum durch Unterdrückung des Protein-Katabolismus, insbesondere der Autophagie. Unter nährstoffreichen Bedingungen phosphoryliert mTORC1 die Autophagie-initiiierende Kinase *unc-51 like autophagy activating kinase 1* (ULK1) und verhindert so dessen Aktivierung durch AMPK (J. Kim et al., 2011).

Eine weitere, noch nicht sehr umfassend untersuchte, zelluläre Funktion von mTORC1 ist die Regulation der Transkription und der RNA-Verarbeitung. mTOR moduliert die Transkription von Genen, die von allen drei RNA-Polymerasen transkribiert werden. Studien konnten hierbei Wechselwirkungen zwischen mTOR und Promotorsequenzen, die von allen drei RNA-Polymerasen verwendet werden, nachweisen (Tsang et al., 2010). Zu den am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren, die durch mTORC1 reguliert werden, gehören die bereits genannten SREBPs und HIF1 $\alpha$  (Düvel et al., 2010), aber auch die Assoziation von *yin yang 1* (YY1) mit seinem Coaktivator *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha* (PGC1 $\alpha$ ), die zusammen die Aktivierung des mitochondrialen Genprogramms regulieren (Cunningham et al., 2007).

Während mTORC1 das Zellwachstum und den Stoffwechsel reguliert, steuert mTORC2 stattdessen die Proliferation und das Überleben hauptsächlich durch Phosphorylierung mehrerer Mitglieder der Proteinkinase-Familie der AGC (protein kinases A, G, C) (Jacinto et al., 2004). mTORC2 reguliert das Aktin-Zytoskelett durch *protein kinase c alpha* (PKC $\alpha$ ), kann jedoch auch andere Mitglieder der PKC-Familie phosphorylieren, welche verschiedene regulatorische Funktionen bei der Zellmigration und bei der Remodellierung des Zytoskeletts einnehmen (Gan et al., 2012). Die wichtigste Rolle von mTORC2 ist jedoch die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, einem Enzym des PI3K (*phosphoinositide 3-kinases*)/Akt-Signalweges, das durch Phosphorylierung und Inhibierung verschiedener Substrate zahlreiche Auswirkungen auf die Homöostase der Zelle hat und die Apoptose, die Proliferation und den Stoffwechsel reguliert (Sarbasov et al., 2005).



**Abbildung 4: Hauptkomponenten des mTOR-Signalwegs.** Wichtige Komponenten der beiden Komplexe mTORC1 und mTORC2. Vorgeschaltete Regulatoren, die Wachstumsfaktoren und zelluläre Energiesignale integrieren und nachgeschaltete Funktionen wie Translation, Zellwachstum und Proliferation. Quelle: (Madke, 2013)

Anfängliche Studien zu Rapamycin zeigten, dass es sich bei mTORC1 um einen nachgeschalteten Mediator mehrerer Wachstumsfaktoren und Mitogen-abhängiger Signalwege handelt. Bei den extrazellulären Aktivatoren des mTOR-Signalwegs handelt es sich beispielsweise um den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Insulin, *insulin-like growth factor 1* (IGF1), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und Glutamat (Lenz & Avruch, 2005; Nie et al., 2010). Diese Faktoren hemmen den Tuberösen Sklerose Komplex (TSC), einen wichtigen negativen Regulator des mTORC1-Signalwegs. Bei TSC handelt es sich um einen Proteinkomplex, der aus TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) besteht. Dieser Komplex fungiert als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), welches mTORC1 direkt bindet und aktiviert (Sancak et al., 2007). Mehrere Signalkaskaden interagieren indirekt mit TSC, was zu dessen Phosphorylierung und Inaktivierung und damit einhergehend zur Aktivierung von mTORC1 führt. Bei diesen Signalwegen handelt es sich beispielsweise

um Akt, RSK1 (*ribosomal S6 kinase 1*), Erk (extracellular-signal-regulated kinase), Wnt (wingless-type MMTV integration site family) und AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (Bai & Jiang, 2010).

Eine Aktivierung von mTORC1 ist zudem eng an ernährungsbedingte Änderungen der Aminosäuren gekoppelt. So konnte gezeigt werden, dass Rag-GTPasen bei der Erfassung der Aminosäuren durch mTORC1 eine bedeutende Rolle zukommen (Sancak et al., 2008). Die Stimulation durch Aminosäuren konvertiert die Rags in einen aktiven Zustand, wodurch diese Raptor binden und mTORC1 an die lysosomale Oberfläche rekrutieren, auf der sich auch Rheb befindet. mTORC1 ist in diesem Fall nur aktiv, wenn sowohl Rags als auch Rheb aktiviert wurden, wodurch erklärt wird, warum sowohl Wachstumsfaktoren als auch Aminosäuren für die Aktivierung von mTORC1 erforderlich sind.

Darüber hinaus reagiert mTORC1 auf intrazellulären und umweltbedingten Stress, wie niedrige ATP-Spiegel, Hypoxie oder DNA-Schäden. Eine Reduktion der zellulären Energieverfügbarkeit, beispielsweise durch Glucosemangel, aktiviert den durch Stress induzierten metabolischen Regulator AMPK, der mTORC1 über die Phosphorylierung von TSC2 oder Raptor inhibiert (Gwinn et al., 2008). Bei auftretender Hypoxie wird mTORC1 einerseits ebenfalls durch eine AMPK-Aktivierung gehemmt, andererseits aber auch durch die Induktion von REDD1 (*regulated in development and DNA damage responses 1*), was wiederum TSC aktiviert (Brugarolas et al., 2004). Des Weiteren hemmt die DNA-Schadensantwort mTORC1 durch Induktion von p53-Zielgenen, einschließlich der AMPK regulierender Untereinheit PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) und TSC2, wodurch die TSC-Aktivität erhöht wird (Feng et al., 2007).

#### **1.2.4 mTOR – Funktionen im Gehirn**

Im Gehirn steuert der mTOR-Signalweg eine Reihe von Prozessen wie neuronale Differenzierung, neuronale Zellgröße, axonale Wegfindung, Dendritogenese und synaptische Plastizität (Garza-Lombó & Gonsebatt, 2016).

Frühe Studien zeigten bereits eine essentielle Rolle für mTOR in der frühen Gehirnentwicklung. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Mutation im *mtor*-Gen in einem Mausmodell ein Fehlen des Telencephalons zur Folge hat (Hentges et al., 2001). Weitere Hinweise auf die Wichtigkeit von mTOR während der neuronalen Entwicklung zeigten Studien, in denen eine Aktivierung von mTOR induziert wurde. So führte eine frühe embryonale Aktivierung von mTOR zu Mikrozephalie, während eine Aktivierung

in postmitotischen Neuronen corticale Hypertrophie, Störung der corticalen Laminierung und einen frühen Tod nach sich zogen (Kassai et al., 2014). Darüber hinaus wiesen Mäuse mit einer erhöhten mTOR-Aktivität aufgrund von Mutationen in *Tsc1/2* weitere neuronale Anomalien auf. So konnten sowohl in *Tsc1* und *Tsc2*-defizienten Maus- und Zellkulturstudien als auch in Hirnschnitten dieser Mäuse tiefgreifende Veränderungen der neuronalen Architektur und Differenzierung (Tavazoie et al., 2005), eine veränderte Produktion multipler Axone (Choi et al., 2008), eine Vergrößerung neuronaler Somata und dendritischer Dornen und eine reduzierte Anzahl an dendritischer Dornen (Tavazoie et al., 2005) beobachtet werden. Darüber hinaus konnten Studien mit einem hirnspezifischen Knockout von Raptor und Rictor weitere Informationen über die Rolle von mTOR in der Entwicklung des Gehirns hervorbringen. Interessanterweise zeigte sowohl der Knockout von Raptor als auch der von Rictor tiefgreifende Veränderungen. Während ein Knockout von Raptor Mikrozephalie, verminderte Zellgröße, erhöhten Zelltod und eine frühe postnatale Letalität hervorriefen (Cloëtta et al., 2013), hatte ein Knockout von Rictor ebenfalls eine Mikrozephalie, kleinere neuronale Somata und kürzere Dendriten zur Folge (Thomanetz et al., 2013). Die mTOR-Funktion in myelinisierenden Zellen wurde ebenfalls in transgenen Mäusen untersucht. Es konnte eine anhaltende Hypomyelinisierung in Oligodendrozyten nach einer Deletion von *Tsc2* in Mäusen festgestellt werden (Carson et al., 2015). Zudem konnte eine Studie einen Verlust der Myelinisierung im zerebralen Cortex nach dem Verlust von *Tsc1* in neuronalen Zellen nachweisen (Meikle et al., 2007).

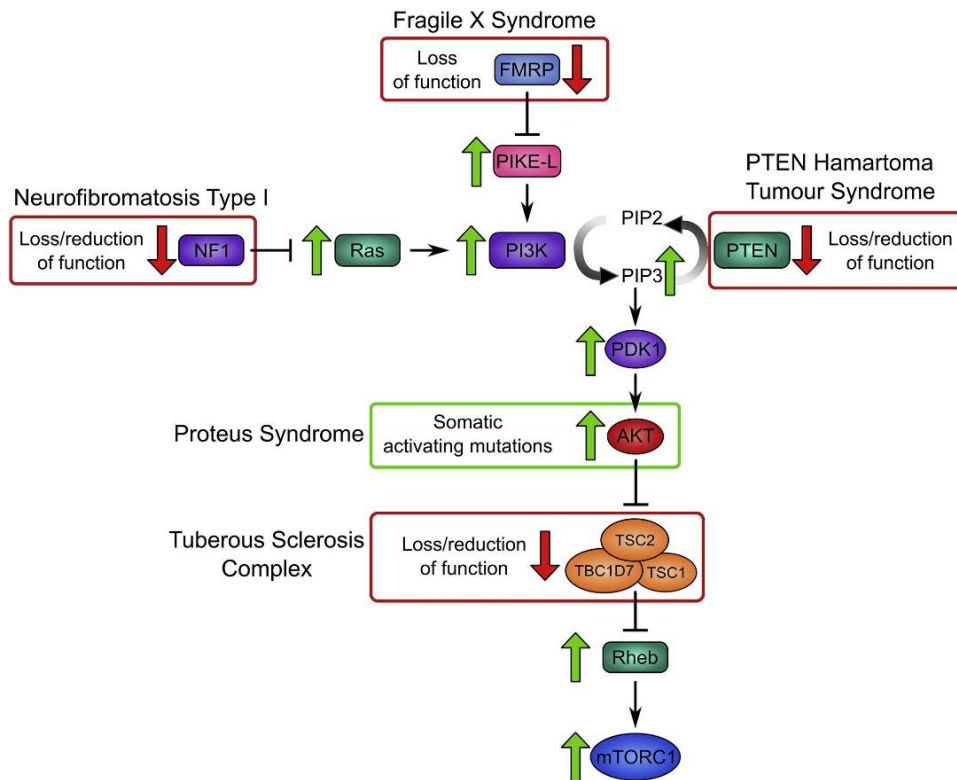
Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass mTOR eine bedeutende Rolle bei der Bildung neuronaler Schaltkreise einnimmt. So gibt es Belege für eine Rolle in der axonalen Wegfindung durch Regulation der lokalen Proteinbiosynthese durch mTOR, wodurch es zu Veränderungen in der Interaktion von Axonen mit ihrer Umgebung kommt (Yoon et al., 2009). Zusätzlich zu der axonalen Wegfindung wirkt sich die lokale Proteinbiosynthese durch mTOR auch auf die Formierung und Aufrechterhaltung von Synapsen aus (Campbell & Holt, 2001).

Die Eigenschaft, Veränderungen in der synaptischen Stärke vorzunehmen, gilt als wesentliche Fähigkeit des Gehirns, Informationen zu speichern. mTOR spielt eine wichtige Rolle bei der Änderung der synaptischen Plastizität. Dies wurde mit Rapamycin behandelten hippocampalen Hirnschnitten der Ratte gezeigt, die eine Proteinsynthesebedingte gestörte Veränderung der Langzeitpotenzierung (LTP) aufwiesen (Tang et al., 2002). Weitere Studien mit Veränderungen direkter oder indirekter mTOR-

Interaktionspartner wie beispielsweise TSC2, 4E-BP2 oder S6K1 zeigten inkonsistente Ergebnisse bezüglich der Langzeitpotenzierung (Banko et al., 2005; Ehninger et al., 2008; Charles A. Hoeffler et al., 2008). mTOR scheint bei der Änderung der Langzeitpotenzierung demnach eine komplexe Rolle einzunehmen. Durch Änderungen der synaptischen Plastizität konnten zudem kognitive Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden. So konnten bei Mäusen Hippocampus-abhängige Veränderungen des Lernens und der Angstkonditionierung nach Modifikation von mTOR durch Änderungen in Tsc2, S6K1 und 4EBP2 beobachtet werden (Antion et al., 2008; Ehninger et al., 2008). Einen Einfluss auf die Transkription durch mTOR konnte im Gehirn bisher nicht endgültig nachgewiesen werden. Es konnte lediglich, wie bereits erwähnt, ein Einfluss von mTOR auf das Transkriptom in embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) gezeigt werden (Düvel et al., 2010). Versuche anhand Rapamycin-behandelter hippocampaler Hirnschnitte zeigten jedoch keine stabilen Veränderungen des Transkriptoms (Blazejczyk et al., 2017).

### **1.2.5 mTORopathien**

Mutationen in Genen, die Komponenten des mTOR-Signalwegs codieren, führen zu genetischen Erkrankungen mit schweren neurologischen Symptomen, den sogenannten mTORopathien. Obwohl jedes dieser genetischen Syndrome seine eigenen einzigartigen Merkmale aufweist, bestehen auch einige phänotypische Gemeinsamkeiten. So sind viele mTORopathien durch Autismus, Epilepsie, Bildung von Tumoren und Intelligenzminderung charakterisiert. Eine Übersicht der prominentesten genetischen Erkrankungen, die mit einer Veränderung der mTOR-Aktivität einhergehen, sind in der Abbildung 5 zusammengefasst.



**Abbildung 5: Funktionsstörung der Zellsignale bei genetischen Erkrankungen mit veränderter mTOR-Aktivität, die durch Mutationen in TSC1, TSC2, PTEN, AKT, NF1 und FXR1 verursacht sind.** Quelle: (Switon et al., 2017)

Die Tuberöse Sklerose (TS) ist eine autosomal-dominante Multisystemerkrankung und die bislang am besten untersuchte mTORopathie. Primäre Manifestationen sind gutartige Tumore und Läsionen in verschiedenen Organen des Körpers sowie Hautveränderungen. Fortschritte in der Bildgebung des Gehirns zeigten zusätzliche Anzeichen im Nervensystem wie Bildung von Knöllchen im Kleinhirn (Ertan et al., 2010) und Hypomyelinisierung in einigen Hirnregionen (Simao et al., 2010). Die häufigsten neurologischen Symptome von TS sind Epilepsie, geistige Behinderung und Autismus-Spektrum-Störung.

Die durch Defekte an PTEN verursachten Erbkrankheiten werden als PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PHTS) zusammengefasst und beinhalten eine Gruppe heterogener Syndrome, die eine autosomal-dominante Mutation im PTEN-Gen aufweisen. Bei PTEN handelt es sich um eine Phosphatase, die den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg durch Dephosphorylierung von Pip3 (*phosphatidylinositol (3,4,5) -triphosphate*) und Verhinderung der Akt-Stimulation negativ reguliert (Song et al., 2012). Zu den genannten Syndromen gehören das Proteus-Syndrom, Cowden-Syndrom, die Lerhmitte-Duclos-Krankheit, das Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom und verschiedene Krebsarten

(Pilarski et al., 2013). Trotz der Heterogenität weisen die Krankheiten auch Gemeinsamkeiten auf, die auch anhand von Tierversuchen mit einer Deletion von *PTEN* festgestellt wurden. Dazu zählen Makrozephalie, Krampfanfälle und eine fehlerhafte soziale Interaktion.

Bei der Neurofibromatose Typ I (NF1) handelt es sich um ein neurokutanes Syndrom, das durch die Entwicklung von gut- und bösartigen Tumoren des zentralen Nervensystems, sowie durch Anomalien an Haut, Knochen und Nieren, Lernschwierigkeiten und Angstzuständen gekennzeichnet ist (Johannessen et al., 2005). Mutationen im *NF1*-Gen führen zu dieser Erkrankung. *NF1* codiert ein GTPase-aktivierendes Protein, das die Aktivität des Protoonkogens RAS unterdrückt. In einem aktiven Zustand signalisiert Ras an mehrere nachgeschaltete Effektoren, einschließlich der Erk- und mTOR-Signalwege (Johannessen et al., 2005).

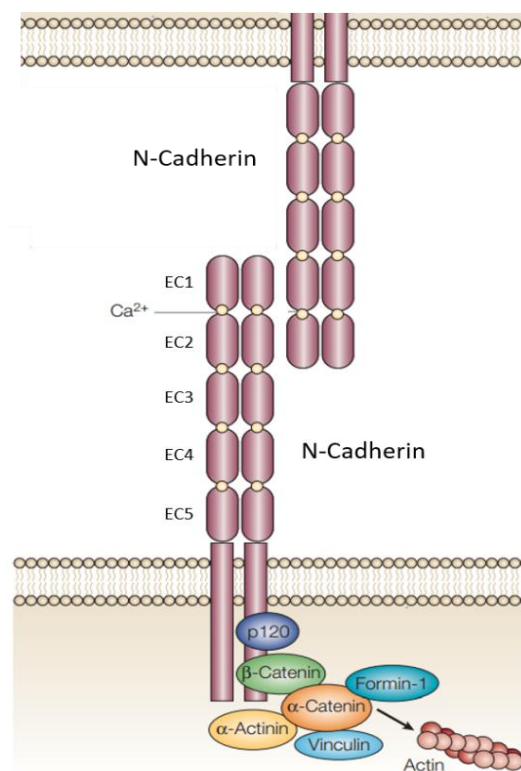
Das Fragile X-Syndrom (FXS) ist eine der verbreitetsten genetischen Ursachen für angeborene geistige Behinderungen bei Männern und eine häufige Ursache für Autismus. Zusätzliche neurologische Symptome sind Hyperaktivität, Schlafstörungen, epileptische Anfälle und Angstzustände. Die Ursache des Syndroms ist der Verlust des FMRP (fragile X mental retardation protein), ein RNA-bindendes Protein, das an der translationalen Stummschaltung von mRNAs beteiligt ist, welche lokal in Dendriten und Postsynapsen translatiert werden. Studien konnten den Nachweis einer erhöhten mTOR-Aktivität in FMRP-deletierten Mäusen und Hirnproben von FXS-Patienten erbringen (C. A. Hoeffler et al., 2012; Sharma et al., 2010).

Autismus ist eine tiefgreifende neurologische Entwicklungsstörung, die durch zwei Hauptmerkmale definiert wird. Erstens anhaltendes soziales Kommunikations- und Interaktionsdefizit und zweitens eingeschränkte und sich wiederholende Verhaltensmuster. Während die Ursachen von Autismus sehr heterogen erscheinen, zeigen Studien einen Zusammenhang zwischen Autismus und genetischen Erkrankungen mit einer fehlerhaften mTOR-Signalübertragung. So können Patienten mit Mutationen sowohl im *TSC1/2*-Gen als auch im *PTEN*-Gen ein autistisches Profil aufweisen (Jeste et al., 2008; Zhou & Parada, 2012). Versuche an Mäusen mit Mutationen im *Tsc1/2* beziehungsweise *PTEN*-Gen konnten zudem einen verhaltensauffälligen Phänotyp bezüglich sozialer Interaktion feststellen, der zumindest zum Teil durch eine Rapamycin-Behandlung reversibel war (Kwon et al., 2006; Sato et al., 2012). Ein direkter Zusammenhang zu mTOR konnte durch Studien mit Deletionen im 4E-BP2-Gen und

einer Überexpression von eIF4E gezeigt werden, wobei Autismus-ähnliche Auffälligkeiten festgestellt werden konnten (Gkogkas et al., 2013; Santini et al., 2013).

### 1.3 N-Cadherin

N-Cadherin ist ein transmembranes Glykoprotein und vermittelt Adhäsion, Signalübertragung, Synapsenbildung und synaptische Plastizität durch homophile Wechselwirkungen innerhalb der synaptischen Spalte und intrazelluläre Bindung an Catenine. N-Cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen des Typs I und besteht aus fünf extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einem zyttoplasmatischen Schwanz, der Wechselwirkungen mit Signalmolekülen und dem Zytoskelett ermöglicht. Abbildung 6 zeigt eine vereinfachte Darstellung der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion zweier Zellen.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Mechanismus des Zell-Zell Kontakts zweier Zellen über eine Adhärenz Junction durch N-Cadherin.** Dargestellt ist der N-Cadherin-Catenin-Proteinkomplex mit den Interaktionen anderer Proteine wie p120, alpha-Actinin, Vinculin und Formin-1 und deren Bindung an Actin (modifiziert nach (Gumbiner, 2005))

Die präzise räumlich-zeitliche Expression von N-Cadherin während der neuronalen Entwicklung ist sehr wichtig. So wird N-Cadherin beispielsweise für die strukturelle Integrität des Neuralrohrs und corticaler Strukturen benötigt. Darüber hinaus trägt N-

Cadherin auch zur zunehmenden Komplexität des zentralen Nervensystems bei, da es Aufgaben bei der Zellmigration, Formierung von Schaltkreisen im Gehirn, der Bildung von Synapsen und Aufrechterhaltung des Pools der Vorläuferzellen übernimmt. Hierbei führt ein Funktionsverlust von N-Cadherin zu einer frühzeitigen Differenzierung und Wanderung neuronaler Vorläuferzellen (Zhang et al., 2010). Eine Überexpression von N-Cadherin dagegen hat eine Blockierung der Differenzierung zur Folge (Rousso et al., 2012). In unreifen Neuronen wird N-Cadherin in entstehenden exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen exprimiert, während es in reifen inhibitorischen Synapsen während der Gehirnentwicklung verschwindet (Benson & Tanaka, 1998). Die Auswirkung einer Störung der N-Cadherin-Funktion wurden sowohl prä- als auch postsynaptisch festgestellt. Hemmung der N-Cadherin vermittelten Adhäsion in der Präsynapse führt zu einer verminderten Rekrutierung von synaptischen Vesikeln in hippocampalen Neuronen (Stan et al., 2010). Postsynaptisch beeinflusst N-Cadherin die Bildung und Reifung von dendritischen Dornen durch indirekte Wechselwirkung mit dem Aktin-Zytoskelett über Catenine (Togashi et al., 2002). Darüber hinaus werden die aktivitätsabhängige Morphogenese dendritischer Dornen und die Langzeitpotenzierung durch N-Cadherin gesteuert (Mendez et al., 2010). Neben den Einflüssen von N-Cadherin auf die Struktur und Morphologie dendritischer Dornen und Synapsen, beschreiben mehrere Studien eine entscheidende Rolle von N-Cadherin für die Funktionalität synaptischer Kontakte. So führte ein Knockout von N-Cadherin zu einer erhöhten synaptischen Depression (Jüngling et al., 2006) und einer stark reduzierten Langzeitpotenzierung (Bozdagi et al., 2010). Die besondere Notwendigkeit von N-Cadherin für die Embryonalentwicklung konnte anhand von N-Cadherin Knockout-Mäusen gezeigt werden, die noch während der Embryogenese im Stadium E10 starben. So konnten eine Verzögerung in der Entwicklung sowie eine fehlerhafte Bildung des Neuralrohrs und des Herzens beobachtet werden (Radice et al., 1997). Anhand konditioneller Knockout-Experimente konnte beobachtet werden, dass ein Fehlen von N-Cadherin im zerebralen Cortex fatale Folgen für die Zellorganisation nach sich zieht. So konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Wanderung neuronaler Vorläuferzellen durch die fehlerhafte Organisation der radialen Gliazellen im zerebralen Cortex nicht mehr möglich war (Kadowaki et al., 2007). Weitere Studien zeigten, dass sowohl eine Überexpression und ein Mangel an N-Cadherin als auch eine fehlerhafte zelluläre Lokalisation zu einer Beeinträchtigung der Neurogenese führen (Kawauchi et al., 2010;

Zhang et al., 2010). Eine präzise Regulation von N-Cadherin scheint demnach notwendig zu sein.

Neueren Studien zufolge könnte N-Cadherin zudem bei der Pathogenese von Autismus eine Rolle spielen (La Fata et al., 2014). So konnte in der Abwesenheit des Fragile-X-Mental-Retardation-Proteins (FMRP), dessen Mutation eine kognitive Behinderung (Fragiles-X-Syndrom) verursacht, eine Verzögerung der neuronalen Wanderung festgestellt und eine verringerte Expression von N-Cadherin dafür verantwortlich gemacht werden. Des Weiteren zeigte ein Knockdown von KIDLIA eine Störung des dendritischen Wachstums und der Formierung von Synapsen, was durch eine beobachtete erhöhte Expression von N-Cadherin begründet sein könnte (Gilbert & Man, 2016). Der Verlust der Expression von KIDLIA wurde als ursächlich für schwere Intelligenzminderung und autistisches Verhalten in mehreren Familien identifiziert (Van Maldergem et al., 2013). Darüber hinaus konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Probanden mit einer *de novo* heterozygoten Mutation des N-Cadherin kodierenden Gens *CDH2* eine syndromale neurologische Entwicklungsstörung mit einer globalen Entwicklungsverzögerung als Hauptmerkmal aufweisen (Accogli et al., 2019).

### 1.3.1 N-Cadherin und mTOR

Mehrere Studien wiesen einen Einfluss von mTOR auf die Proteinexpression von N-Cadherin nach. So zeigte ein Knockout von DEPTOR, dessen Aufgabe die Blockierung der beiden mTOR-Komplexe darstellt, eine erhöhte Expression von N-Cadherin in Tumorgewebeproben auf (J. Chen et al., 2019). Mit einem Knockdown von Raptor, ein weiterer Bestandteil des mTORC1-Komplexes, konnte in der A549-Zelllinie ebenfalls eine erhöhte Expression von N-Cadherin beobachtet werden (E. Y. Kim et al., 2014). In PC12-Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Rapamycin zu einer reduzierten Expression von N-Cadherin führt (Wei et al., 2018). Andererseits zeigten weitere Studien einen gegensätzlichen Effekt. So konnte zum einen in MCF 10A-Zellen eine erhöhte Expression von N-Cadherin nach einer Inhibierung von mTORC1 mittels PP242 (Mikaelian et al., 2013) und zum anderen in AML (*acute myeloid leukemia*)-Zellen eine erhöhte Expression von N-Cadherin nach einer Überexpression von Tuberin, als auch nach einer Behandlung mit Rapamycin beobachtet werden (Liang

et al., 2014). Liang und Kollegen konnten zudem eine verminderte Expression von N-Cadherin in Proben von Nierentumoren von Patienten mit tuberöser Sklerose feststellen. Da bereits bekannt ist, dass die Feinregulation der N-Cadherin Expression essentiell für die neuronale Differenzierung und Wanderung ist, könnte eine Abweichung in der Expression von N-Cadherin in einer fehlerhaften mTOR-Aktivität begründet liegen. Eine durch Dysregulation der mTOR-Aktivität verursachte veränderte Proteinbiosynthese von N-Cadherin könnte so teilweise für Symptome neuronaler Entwicklungsstörungen wie Intelligenzminderung und Autismus verantwortlich sein.

## 1.4 Unmittelbar frühe Gene

Bei den unmittelbar-frühen Genen (IEGs) handelt es sich um Gene, welche vorübergehend und schnell als Reaktion auf eine Vielzahl von zellulären Stimuli aktiviert werden können. Der Begriff unmittelbar-frühe Gene wurde erstmals verwendet, um die viralen Gene zu beschreiben, die innerhalb von 2 Minuten nach der Virustransfektion in Wirtszellen transkribiert werden (Jayaraman, 1972). IEGs können dabei innerhalb weniger Minuten nach einer Stimulation aktiviert und transkribiert werden, ohne dass eine *de novo*-Proteinsynthese erforderlich ist. Sie werden sowohl als Reaktion auf zellexterne (extrinsische) als auch zelleigene (intrinsische) Signale stimuliert (Herschman, 1991). Extrazelluläre Signale werden von der Zelloberfläche über Rezeptoren übertragen, die eine Kette von Proteinen in der Zelle aktivieren, insbesondere die extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERKs) und die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Über Signalkaskaden und Übertragungen von Phosphatgruppen werden Transkriptionsfaktoren schließlich aktiviert und in den Kern transloziert, wodurch die Genexpression aktiviert wird. Hierbei können diverse Stimuli die Expression verschiedener IEGs anschalten, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, zellulärer Stress oder DNA-Schäden.

Wie bereits angedeutet, erfolgt die Transkription der IEGs über die Aktivierung des Erk-respektive MAPK-Signalwegs, die dem mTOR-Signalweg vorangeschaltet sind. Diese Signalwege können untereinander auch mit starken Wechselwirkungen einhergehen. So wird die Signaldynamik häufig stark von sowohl positiven als auch negativen Rückkopplungsschleifen beeinflusst. Mehrere Studien konnten anhand der Hemmung des mTOR-Signalwegs eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs aufzeigen, was eine mTOR-MAPK Rückkopplungsschleife darstellt. (Carracedo et al., 2008). Zudem ist wie bereits

angedeutet, bekannt, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu einer Hochregulation verschiedener IEGs wie *cFos* und *Junb* führt (Murphy & Blenis, 2006). Eine fehlerhafte Aktivität von mTOR könnte demnach Einfluss auf eine indirekte Regulation der Expression verschiedener IEGs über eine Veränderung der Aktivität des MAPK-Signalwegs ausüben.

Die IEGs haben eine wesentliche biologische Rolle, insbesondere bei Stressreaktionen wie z.B. der Immunantwort und der Differenzierung. Daher spielen sie bei der Entstehung von verschiedenen Krankheiten wie z.B. Krebs eine wichtige Rolle (Ozanne et al., 2006).

Darüber hinaus sind IEGs essentiell für die Entwicklung des Gehirns und das Lernen. Im Gehirn werden IEGs vor allem durch neuronale Aktivität und Neurotransmitter, aber beispielsweise auch bei Verletzungen des Gehirns oder Krampfanfällen induziert. Zusätzlich spielen diese Gene eine wesentliche Rolle bei zellulären Reaktionen, die zur langfristigen neuronalen Plastizität beitragen (Minatohara et al., 2016).

Beispiele für im Gehirn aktive IEGs sind *cFos*, *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), *Egr-4* (early growth response 4), *Npas4* (neuronal PAS domain-containing protein 4), *Junb* und *Homer1a*. Funktionell können die IEGs in zwei Hauptklassen eingeteilt werden - Transkriptionsfaktoren, welche die nachgeschaltete Genexpression regulieren, wie beispielsweise *cFos* und *Npas4* und Effektorproteine, welche die Zellfunktion direkt modulieren, wie *Arc* und *Homer1a*. Die Mehrzahl an Transkriptionsfaktor-IEGs wird schnell induziert, während Effektor-IEGs mit Ausnahme von *Arc* im Allgemeinen langsamer induziert werden (Abraham et al., 1991).

*cFos* ist an der Zellproliferation und -differenzierung, induziert durch extrazelluläre Stimuli beteiligt, während seine Dysregulation mit einer erhöhten Tumorprogression in Verbindung gebracht wurde. *CFos* kann mit Mitgliedern der JUN-Familie, wie beispielsweise *JunB* heterodimerisieren, um das Transkriptionsfaktor-Aktivatorprotein 1 (*AP-1*) zu bilden (Curran & Franza, 1988). Als AP-1-Heterodimer wird *cFos* als Hauptschalter angesehen, der kurzfristige Stimuli in langfristige Reaktionen umwandelt. Zusätzlich wird *cFos* derzeit als Marker für neuronale Aktivität verwendet und wurde mit einer Reihe von neuronalen und Verhaltensreaktionen auf die Expression akuter Reize in Verbindung gebracht. Anhand von KO-Experimenten konnte die Wichtigkeit von *cFos* für die Entwicklung des Gehirns verifiziert werden. Ein reduziertes Körpergewicht von *cFos* Knockout-Mäusen um 50 % wurde mit einer verminderten Zellanzahl des Gehirns in Verbindung gebracht. *cFos* defiziente Embryonen zeigen eine Verringerung der Dicke

des sich entwickelnden Cortex um ca. 15 % im Vergleich zum Wildtyp (Velazquez et al., 2015). Bei dieser Studie wurde zudem eine erhöhte Anzahl an neuronalen Vorläuferzellen und eine verringerte Anzahl an postmitotischen Neuronen festgestellt. Zusammengenommen unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung von *cFos* für die Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn.

*Npas4* ist es ein IEG mit einzigartigen Eigenschaften. Erstens wird *Npas4* ausschließlich in Neuronen exprimiert und zweitens wird es nur durch neuronale Aktivität, nicht aber durch Wachstumsfaktoren oder Neurotrophine induziert. Darüber hinaus scheint *Npas4* die Expression einer großen Anzahl aktivitätsabhängiger Gene direkt zu steuern (Lin et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass *Npas4* sowohl für die Entwicklung glutamaterger als auch der GABAerger Synapsen in Neuronen wichtig ist (Spiegel et al., 2014). *Npas4* scheint besonders essentiell für die aktivitätsabhängige Regulation einer großen Anzahl von Genen zu sein. In *Npas4*-defizienten Neuronen konnte eine reduzierte aktivitätsabhängige Induktion einer großen Anzahl von Genen, einschließlich der meisten bekannten IEGs, festgestellt werden (Ramamoorthi et al., 2011). Die Deletion von *Npas4* in Mäusen führte zu einer Beeinträchtigung der langfristigen Gedächtnisbildung. Zudem konnte bei diesen Mäusen kein kontextuelles Angstgedächtnis ausgebildet werden (Ramamoorthi et al., 2011). In weiteren Studien in *Npas4*-defizienten Mäusen konnten verschiedene Verhaltensstörungen festgestellt werden, darunter eine Hyperaktivität in einer neuartigen Umgebung, eine Störung der Präpuls hemmung, soziale Interaktionsdefizite und kognitive Beeinträchtigungen (Coutellier et al., 2012). Diese Ergebnisse legen nahe, dass *Npas4* eine wichtige Rolle bei der Regulation kognitiver und sozialer Funktionen im Gehirn spielt, mit möglichen Auswirkungen auf Entwicklungsstörungen wie Schizophrenie und Autismus.

Bei *Homer1* handelt es sich um ein postsynaptisches Protein, das die synaptische Architektur zusammen mit anderen Proteinen wie Shank aufrechterhält. Dies gilt für die beiden Spleißvarianten *Homer1b* und *Homer1c*. Bei *Homer1a* dagegen handelt es sich um ein IEG, welches die Interaktionen der anderen beiden Spleißvarianten blockiert. Dadurch entkoppelt *Homer1a* die mGluR- (*metabotropic glutamate receptor*) Signalübertragung und verkleinert dadurch die dendritische Dornenstruktur (Sala et al., 2003). *Homer1a* ist darüber hinaus wichtig für die neuronale Plastizität und die Angstkonditionierung (Celikel, 2007). *Homer1a* resultiert aus der Verwendung der proximalen PolyA-Stelle des fünften Introns, während bei der distalen PolyA-Stelle die beiden Proteine *Homer1b* und *Homer1c* entstehen. Im Gegensatz zu den meisten IEGs,

hat Homer1a sehr spezifische Funktionen, da es direkt an den Synapsen agiert. Fehlexpression von Homer1a mündet in einer fehlerhaften Angstkonditionierung und einer reduzierten sozialen Interaktion (Banerjee et al., 2016).

## 1.5 Cholesterin

Beim Cholesterin handelt es sich um einen wesentlichen Bestandteil aller eukaryotischer Membrane. Es erhöht die Stabilität der Membrane und trägt gemeinsam mit Proteinen dazu bei, Signalstoffe zu transportieren. Unterschiedliche Cholesterinkonzentrationen regulieren die Membranfluidität und damit die strukturelle Integrität und funktionelle Spezifität verschiedener zellulärer Orte, einschließlich Membrantransport und der Transmembransignalisierung (Schroeder et al., 1991). Insbesondere der Cholesterinspiegel der Membrane stellt einen Schlüsselfaktor für die Bestimmung der Stabilität und Organisation von Mikrodomänen, sogenannter *lipid rafts*, dar (Korade & Kenworthy, 2008). Cholesterin dient darüber hinaus als Vorläufer aller Steroidhormone und Gallensäuren. Für den Transport innerhalb des Körpers wird Cholesterin an Lipoproteine gebunden, welche je nach Dichte in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Fehlgeschalteter Cholesterin-Metabolismus ist mit diversen Störungen wie Atherosklerose, Gallensteine oder der familiären Hypercholesterinämie verknüpft. Da Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und somit kein Transport von Cholesterin stattfinden kann, wird fast das gesamte Cholesterin im Gehirn *in situ* synthetisiert. Obwohl das Gehirn nur 2-5 % der gesamten Körpermasse einnimmt, sind 25 % des Gesamtcholesterins im Gehirn zu finden (Dietschy & Turley, 2001). Das Gehirn verfügt daher mit 15-20 mg/g Gewebe eine deutlich höhere Cholesterinkonzentration als das restliche Körpergewebe mit ca. 2 mg/g Gewebe (Dietschy & Turley, 2004). Der Großteil des Cholesterins (bis zu 90 %) des zentralen Nervensystems ist in den Myelinschichten zu finden, welche die Axone umwickeln, dessen Aufgabe die Weiterleitung elektrischer Impulse darstellt. Darüber hinaus wird Cholesterin auch für den Aufbau von Dendriten und Synapsen, einschließlich der postsynaptischen Dornen und präsynaptischen Vesikel benötigt (Goritz et al., 2005). Cholesterin spielt demnach eine essentielle Rolle als Bestandteil der Formierung von Synapsen und Dendriten und bei der axonalen Wegführung. Die Cholesterinsynthese des Gehirns erreicht ihren Höhepunkt in den Oligodendrozyten bei der aktiven Myelinisierung während der Entwicklung des Gehirns und wird um etwa 90 % nach dem Abschluss der Myelinisierung in Erwachsenen heruntergefahren (Dietschy & Turley, 2004).

Cholesterin ist hierbei sowohl vor allem während der Entwicklung als auch im Erwachsenenstadium für die neuronale Physiologie essentiell. Ein vermindertes Cholesterin-Level in Neuronen beeinträchtigt die Exozytose synaptischer Vesikel, die neuronale Aktivität und die Neurotransmission, was zu einer Degeneration von dendritischen Dornen und Synapsen führt (Linetti et al., 2010; J. P. Liu et al., 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass es durch eine experimentelle Entfernung von Cholesterin in neuronalen Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung bei Mäusen zu einer Verringerung der Gehirngröße und zur perinatalen Letalität kommt (Saito et al., 2009). Darüber hinaus führen Defekte im Cholesterinstoffwechsels zu strukturellen und funktionellen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie dem Niemann-Pick C (NPC) Syndrom, Huntington, Alzheimer oder Parkinson. Beim Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS) handelt es sich um eine autosomal rezessive Neuroentwicklungsstörung, die durch Mutationen im *DHCR7* (7-Dehydrocholesterinreduktase)-Gen verursacht wird, das den letzten Schritt des Cholesterin-Biosynthesewegs katalysiert. Daraus resultiert einerseits eine verminderte Cholesterinmenge und andererseits eine Akkumulation des Cholesterinvorläufers 7-Dehydrocholesterin sowohl im Plasma als auch in den Zellen des Gehirns. SLOS ist durch mehrere Entwicklungsstörungen wie beispielsweise Intelligenzminderung, Mikrozephalie, Wachstumsprobleme und Gesichtsveränderungen gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass neuronale Zellen ihren Cholesteringehalt über Rückkopplungsmechanismen regulieren, welche Biosynthese, Import und Ausscheidung in Einklang bringen. Zellen erfassen ihren Cholesterinspiegel durch membrangebundene Transkriptionsfaktoren, welche, wie bereits erwähnt, als SREBPs bekannt sind und die Transkription von Genen regulieren, die bei der Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese involviert sind (M. S. Brown & Goldstein, 1999).

## 1.6 mTOR – Rolle in der Cholesterinbiosynthese

Anhand Studien mehrere Tiermodelle konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von mTORC1 mit der Biosynthese von Cholesterin korreliert (Mathews & Appel, 2016). Ein wesentlicher Bestandteil in der Regulation der Expression von Genen der Biosynthese von Cholesterin bilden die Transkriptionsfaktoren der SREBP-Familie (Horton et al., 2002). So aktivieren nährstoffreiche Bedingungen mTORC1 um die Adipogenese zu erhöhen (Laplanche & Sabatini, 2012), um die mitochondriale Biogenese im Muskel zu regulieren (Polak et al., 2008) und um die hepatische Lipogenese durch Aktivierung der

SREBPs zu fördern (Sengupta et al., 2010). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Inaktivierung von SREBP die von Akt abhängige Lipogenese hemmt. Es wird hierbei vermutet, dass die Achse um PI3K/Akt/mTOR die Biosynthese von Proteinen und Lipiden auf eine fein koordinierte Weise regulieren (Porstmann et al., 2008). Zusätzlich haben Studien gezeigt, dass eine Hemmung von mTORC1 die Funktion von SREBP beeinträchtigt und dazu führt, dass Mäuse in einer Abhängigkeit von Lipin 1 tolerant gegenüber Hypercholesterinämie werden, die durch eine fett- und cholesterinreiche Ernährung induziert wird (Peterson et al., 2011). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Inhibierung von mTORC1 mit einer fehlenden Translokation des SCAP (SREBP cleavage-activating protein)/SREBP-2-Komplexes vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat einhergeht, wodurch es zu einer reduzierten Expression von LDLR (*low density lipoprotein receptor*) und SREBP-2 kommt. Hierbei kam es dazu noch zu einer erhöhten Degradierung von LDLR (J. Liu et al., 2015).

Angesichts der zentralen Rolle von mTORC1 bei der Biogenese von Lipiden und Cholesterin gibt es eine begründete Annahme, dass die Aufnahme von Lipiden einen Effekt auf die Aktivität von mTORC1 hat. So wird aufgeführt, dass eine fettreiche Ernährung die mTORC1-Aktivität bei Mäusen stimuliert (Um et al., 2004). In Zellkulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Reduktion von Cholesterin durch Methyl-beta-Cyclodextrin die mTORC1-Signalübertragung reduziert wurde. Eine Exposition dieser Zellen mit LDL konnte die mTORC1-Aktivität wiederum reaktivieren (Castellano et al., 2017). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass durch eine Inaktivität von mTORC1 der Transport von Autophagosomen und Endosomen zu den Lysosomen verhindert wird. Somit steigt das Cholesterin in den Lysosomen und im endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zu einer Unterdrückung von SREBP-2 kommt. Umgekehrt unterdrückt eine hohe mTORC1-Aktivität die Autophagie, was zu einem niedrigen Cholesterin-Niveau im endoplasmatischen Retikulum und schließlich zu einer Aktivierung von SREBP-2 führt (Eid et al., 2017). Erst kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inhibierung von mTORC1 in NPC1 (NPC intracellular cholesterol transporter 1) -defizienten Neuronen die dort fehlerhafte Funktion verschiedener Zellorganellen korrigieren konnte (Davis et al., 2020). LDLR fungiert indirekt als Transporter von Cholesterin. Hierfür konnte in hepatischen Untersuchungen in Mäusen eine Reduktion der Expression von LDLR nach einer einwöchigen Behandlung mit Rapamycin beobachtet werden (Ai et al., 2012). Zudem konnte eine Studie von Düvel et al., 2010 zeigen, dass in *Tsc1* und *Tsc2*-defizienten *mouse embryonic*

*fibroblasts* (MEFs), also nach einer Hyperaktivität von mTORC1, eine signifikant erhöhte Expression verschiedener Gene gezeigt wird, welche in der Cholesterin-Biosynthese eine Rolle spielen.

## 1.7 Hypothese/ Ziel dieser Arbeit

Es wird angenommen, dass eine Funktionsstörung des mTOR-Signalwegs die Hauptursache für verschiedene neurologische Entwicklungsstörungen wie Autismus-Spektrum-Störung (ASD), geistige Behinderung (ID) und Epilepsie ist. Während angenommen wird, dass die Dysregulation von mTOR zur Entwicklung und zum Fortschreiten dieser Krankheiten beiträgt, sind die Folgen einer mTOR-Dysregulation auf molekularer und zellulärer Ebene kaum bekannt. Die Identifizierung von Mechanismen ist wichtig, um die neuronale mTOR-Funktion sowie die Pathogenese neurologischer Entwicklungsstörungen zu verstehen, die mit Änderungen der mTOR-Aktivität verbunden sind.

Ziel der Arbeit war die Identifizierung neuer Zielgene, die durch mTOR reguliert werden und deren Dysregulation an der Progression von neuronalen Erkrankungen beteiligt sein könnte. Im ersten Teil der Arbeit sollte über einen Kandidatenansatz das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin untersucht werden. Eine Feinregulation der Expression von N-Cadherin ist essentiell für die neuronale Differenzierung und Wanderung (Rago et al., 2014). Eine Abweichung dieser Expression durch eine fehlerhafte mTOR-Aktivität könnte bei der Entstehung von neuronalen Erkrankungen mitverantwortlich sein. Als Zellmodell dienten neben HeLa-Zellen vor allem primäre corticale Mausneuronen. Ein möglicher Einfluss von mTOR auf die Expression von N-Cadherin und dessen Regulation sollte über einen experimentellen Ansatz durch Inhibierung des mTOR-Signalwegs mittels Temsirolimus erfolgen. Nach Etablierung der primären corticalen Mausneuronenkultur und einer Aufrechterhaltung der Vitalität nach einer Temsirolimus-Behandlung, wurde das Expressionsmuster von N-Cadherin nach dieser mTOR-Inhibierung anhand qPCR- und Westernblot-Experimenten untersucht. Im Anschluss wurde die Regulation von N-Cadherin durch mTOR mit Hauptaugenmerk auf die posttranskriptionelle Regulation über den 3'UTR von N-Cadherin analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein hypothesefreier Ansatz verfolgt, um einen möglichen Einfluss von mTOR auf das Transkriptom der corticalen Neuronen zu untersuchen. Arbeiten an embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs) hatten bereits eine

Veränderung des Transkriptoms bei einer Abweichung der mTOR-Aktivität gezeigt (Düvel et al., 2010). Hierbei kam es vor allem zu Veränderungen verschiedener Stoffwechselwege wie der Glykolyse und der Cholesterinbiosynthese. Eine durch fehlerhafte mTOR-Aktivität verursachte Fehlregulation der Biosynthese von Cholesterin im Gehirn könnte teilweise für die Progression neuronaler Erkrankungen während der Embryonalentwicklung verantwortlich sein. Mögliche Änderungen des Transkriptoms sollten anhand von RNA-Sequenzierungs-Experimenten aufgezeigt werden. Nach der Verifizierung dieser Ergebnisse mittels qPCR wurde versucht die Ergebnisse mittels intraperitonealer Injektionen *in vivo* zu reproduzieren. Abschließend wurde die Regulation der veränderten Transkription der Gene durch mTOR näher beleuchtet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Fluoreszenzmikroskop LSM 710 NLO</b>	Carl Zeiss
<b>Mikroskop SZX100</b>	Olympus
<b>Mikroskop Zeiss Axiovert25</b>	Carl Zeiss
<b>Mikroskop EVOS XL</b>	Life Technologies
<b>Nanodrop Spectrophotometer ND-1000</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Nanodrop Spectrophotometer OneC</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Cycler PTC-200</b>	MJ Research
<b>StepOnePlus™ Real-Time PCR System</b>	Applied Biosystems
<b>HeraSafe Sterilbank</b>	Heraeus
<b>Wasserbad VWB26</b>	VWR
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator Serie CB</b>	Binder
<b>Zentrifuge Megafuge 16R</b>	Heraeus
<b>Zentrifuge Peqlab PerfectSpin 24R</b>	Peqlab
<b>Qubit® 2.0 Fluorometer</b>	Life Technologies
<b>ChemiDoc™ MP Imaging System</b>	Bio-Rad
<b>Luminometer Centro LB 960</b>	Berthold Technologies
<b>TransBlot Turbo Transfer System</b>	Bio-Rad
<b>2100 Bioanalyzer Instrument</b>	Agilent Technologies
<b>NextSeq 550 System</b>	Illumina
<b>HiSeq 2500 System</b>	Illumina
<b>FluoSTAR Optima Microplate Reader</b>	BMG Labtech

**Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und ihre Hersteller.**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ethanol (100 %)</b>	AppliChem
<b>Ethanol denaturated</b>	VWR International
<b>Isopropanol</b>	Carl Roth
<b>DMEM</b>	Sigma-Aldrich
<b>DMEM high Glucose</b>	Gibco® Life Technologies
<b>Opti-MEM Reduced Serum</b>	Gibco® Life Technologies
<b>Neurobasal® Medium</b>	Gibco® Life Technologies
<b>DPBS</b>	Gibco® Life Technologies
<b>FBS</b>	Gibco® Life Technologies
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	Gibco® Life Technologies
<b>B27-Supplement</b>	Gibco® Life Technologies
<b>GlutaMAX</b>	Gibco® Life Technologies
<b>Trypsin-EDTA (0,05 %)</b>	Gibco® Life Technologies
<b>N2-Supplement</b>	Gibco® Life Technologies
<b>Poly-D-Lysin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Poly-L-Ornithine</b>	Sigma-Aldrich
<b>Laminin</b>	Sigma-Aldrich
<b>Torin1</b>	Cell Signaling
<b>Temsirolimus</b>	Sigma-Aldrich
<b>Rapamycin</b>	LC Laboratories
<b>U0126</b>	ApexBio Technology
<b>Actinomycin D</b>	Sigma-Aldrich
<b>Cycloheximid</b>	Sigma-Aldrich
<b>Methyl-beta-Cyclodextrin</b>	Sigma-Aldrich
<b>IGF-1</b>	BioTechne
<b>Tetrodotoxin</b>	Abcam
<b>BSA</b>	New England Biolabs

<b>Formaldehyd</b>	Sigma-Aldrich
<b>EDTA</b>	AppliChem
<b>HT1 Hybridization Buffer</b>	Illumina
<b>DNA Exitus</b>	Appllichem
<b>Magnesiumchlorid</b>	Carl Roth
<b>Magnesiumsulfat</b>	Carl Roth
<b>Kaliumchlorid</b>	Carl Roth
<b>IGEPAL CA-630</b>	Sigma-Aldrich
<b>Natriumacetat</b>	Carl Roth
<b>HEPES</b>	Carl Roth
<b>NP-40</b>	Abcam
<b>DTT</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Proteinase K</b>	Appllichem
<b>ATP</b>	Sigma-Aldrich
<b>Luciferin</b>	Sigma-Aldrich
<b>T4 DNA Ligase</b>	New England Biolabs
<b>DNA Polymerase</b>	Axon Labortechnik
<b>NdeI</b>	New England Biolabs
<b>PageRuler Prestained Protein Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Lipofectamine 2000</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Oligofectamine</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>dNTP</b>	Roche
<b>RNasin Plus Ribonuclease Inhibitor</b>	Promega
<b>Phenol</b>	Carl Roth
<b>Chloroform</b>	Carl Roth
<b>Glycogen</b>	Roche
<b>Protein G Agarose</b>	Roche
<b>Dynabeads M-280 Streptavidin</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Bio-11-UTP</b>	Invitrogen® Life Technologies

<b>Normal Sheep Serum</b>	Abcam
<b>RNase away</b>	Molecular BioProducts
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	Braun
<b>RNAlater</b>	Sigma-Aldrich
<b>DMSO</b>	Sigma-Aldrich
<b>Acrylamid/Bisacrylamid 30 %</b>	Carl Roth
<b>SDS</b>	Carl Roth
<b>Ammoniumperoxodisulfat</b>	Carl Roth
<b>Milchpulver</b>	Carl Roth
<b>Harnstoff</b>	Carl Roth
<b>TRIS</b>	Carl Roth
<b>Glycin</b>	Carl Roth
<b>Glycerin</b>	Carl Roth
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Carl Roth
<b>Bromphenolblau</b>	Carl Roth
<b>Triton X 100</b>	Carl Roth
<b>Tween 80</b>	Carl Roth
<b>Albumin Fraktion V</b>	Carl Roth
<b>Salzsäure 32 %</b>	Carl Roth
<b>Essigsäure</b>	Carl Roth
<b>Agar-Agar</b>	Carl Roth
<b>Formamid</b>	Carl Roth
<b>6x Loading Dye</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Agarose</b>	Appllichem
<b>Hefeextrakt</b>	Carl Roth
<b>Natriumcitrat</b>	Carl Roth
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth
<b>Paraformaldehyd</b>	Carl Roth
<b>Sucrose</b>	Sigma-Aldrich

<b>Trypton</b>	Carl Roth
<b>Ampicilin</b>	Applichem
<b>cOmplete Protease Inhibitor Tablets</b>	Roche
<b>Ethidiumbromid</b>	Carl Roth
<b>PBS Tabletten</b>	Gibco® Life Technologies
<b>PhosSTOP Tabletten</b>	Roche
<b>TEMED</b>	Invitrogen® Life Technologies
<b>Protease Inhibitor Cocktail Tabletten</b>	Roche
<b>Trypanblau</b>	Carl Roth
<b>GeneRuler 100 bp DNA Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>PrimeScript™ RT Master Mix</b>	Takara/Clontech
<b>SYBR® Premix Ex Taq</b>	Takara/Clontech
<b>Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium</b>	Sigma-Aldrich
<b>Hoechst 33258</b>	Sigma-Aldrich
<b>Phase Lock Gel Tubes</b>	VWR
<b>Negative Control siRNA</b>	Qiagen
<b>Negative Control Accell siRNA</b>	Dharmacon
<b>SMARTpool Accell cFos siRNA</b>	Dharmacon
<b>HuR siRNA_1</b>	Qiagen
<b>HuR siRNA_11</b>	Qiagen

Tabelle 3: Verwendete Kits und ihre Hersteller.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Western Lightning Plus-ECL Kit</b>	PerkinElmer
<b>QIAshredder</b>	Qiagen
<b>QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit REV</b>	Lexogen
<b>PCR Add-on Kit</b>	Lexogen
<b>High Pure RNA Isolation Kit</b>	Roche

<b>Agencourt AMPure XP Beads</b>	Beckman Coulter
<b>MinElute PCR Purification Kit</b>	Qiagen
<b>Poly(A) Tailing Kit</b>	New England Biolabs
<b>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Advantage HF 2 PCR Kit</b>	Takara
<b>pGEM-T Easy Vector Kit</b>	Promega
<b>Renilla Luciferase Assay System</b>	Promega
<b>NEBNext 2x PCR Master Mix</b>	New England Biolabs
<b>Amplex Red Cholesterol Assay Kit</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>RNeasy Micro Kit</b>	Qiagen
<b>EndoFree Plasmid Maxi Kit</b>	Qiagen
<b>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit</b>	Agilent
<b>RiboMAX Large Scale RNA T7 System</b>	Promega
<b>Tagment DNA Enzyme and Buffer Kit</b>	Illumina
<b>High Output Reagent Cartridge v2, 75 cycles</b>	Illumina
<b>Flow Cell</b>	Illumina

Tabelle 4: Verwendete Primer für qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>N-Cadherin</b>	gccatcatcgctatcctct	ccgttcatccataccacaaa
<b>Fosb</b>	gttcgcagagagcggaac	ctgcctttctcttcaagc
<b>cFos</b>	cagccttctactaccattcc	acagatctgcgcaaaagtcc
<b>Egr4</b>	gacgcgcttctctccaag	agcccagctcaagaagtgc
<b>Npas4</b>	agggttgctgatgagttgc	tcccctccacttccatct
<b>Junb</b>	ccacggaggagagaaaatc	agttggcagctgtgcgtaa
<b>Ldlr</b>	agaggggtgaactggtgtga	caggtactggcaaccacat
<b>Osc</b>	ggggcatacctaccaagatg	ccgctgttcacatgattcaa
<b>Mvd</b>	ctgaatggtcgcgaggag	gagtgccccgtctctgt
<b>Nsdhl</b>	cgccatgaagcctattgacta	ttagggtcgttgcatcc

<b>Acss2</b>	gcctgcaatcctgaatgagt	cagggtgcttgaacacc
<b>Sqle</b>	catgagtctccggaagcag	tgaagcacaacacctctataaactt
<b>Dhcr7</b>	ccagcagaatggcttgttct	aatagatgggtggctccaag
<b>Dhcr24</b>	ggctcatgacggacgacgta	agggtttagtaactgccaat
<b>Pfkp</b>	gagggaccccatctgcat	gtagctccagcaaggcaat
<b>Pgm2</b>	gcgactggaccaggagac	gctgttccactgactcagaggta
<b>Pdk1</b>	gttgaaacgtcccgtgct	gcgtgatatgggcaatcc
<b>GAPDH</b>	gggttcctataaatacggactgc	tacggcctaatccgttcaca

Tabelle 5: Verwendete Primer für ChIP-qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Aurka</b>	aacagccatgtcccttccaac	agctaccgggatcgttggag
<b>MyoD1</b>	tccgggacatagacttgaca	cgggtcatcatagaagtctgc
<b>Mvd</b>	acgcgctgccatagtatt	tccataggctaaaaagtggatca
<b>Nsdhl</b>	ctgtgagcgtcaattggtg	caatcagcagagcttcttca
<b>Dhcr7</b>	cgtcctgctgcaatctcaa	gattggatgaaggcagtgagc

Tabelle 6: Verwendete Primer für cDNA + PCR.

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Cdh2-5</b>	acggcaggacggacttgctt	tgagtaattttttaaactggttg
<b>Cdh2-6</b>	tggagtgatttgtaccttgg	ccagatccaaaattagcttttattc
<b>Cdh2-5-mut</b>	gtagttagaataactcaagcgtctgtgtgtgtacc	ggtacacaacacagacgcttgagtattctaactac
<b>M13</b>	tgtaaacgacggccagt	caggaaacagctatgacc
<b>Anker-Primer</b>		gaccacgcgtatcgatgctgac
<b>oligodT</b>		gaccacgcgtatcgatgctgacttttttttttttv
<b>Ncad-RACE</b>	actagcaccgtgcttgc	

**Tabelle 7: Verwendete Plasmide für Transfektionen.**

Name	Resistenz
pGL3P-empty (=Ctrl)	Ampicillin
pGL3P-Ncad UTR short	Ampicillin
pGL3P-Ncad UTR long delPolyA	Ampicillin
pGL3P-Ncad UTR long	Ampicillin
pGL3P-Ncad UTR long delHuR	Ampicillin
pRL-TK	Ampicillin

**Tabelle 8: Verwendete primäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller zur Immunfärbung von Zellen und Hirnschnitten.**

Antikörper	Spender	Konzentration	Hersteller	Artikelnummer
<b>GFAP</b>	Kaninchen	1:1000	Abcam	ab7260
<b>β-III-Tubulin</b>	Maus	1:400	Sigma-Aldrich	T8660
<b>NF-YA</b>	Maus	1:200	Santa Cruz	sc-17753
<b>N-Cadherin</b>	Maus	1:500	BD Biosciences	610921
<b>MAP2</b>	Kaninchen	1:500	Abcam	ab32454
<b>Tau</b>	Kaninchen	1:500	Abcam	ab32057

**Tabelle 9: Verwendete sekundäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller zur Immunfärbung von Zellen.** Angegebene Konzentrationen beschränken sich auf die Färbung der Hirnschnitte

Antikörper	Spender	Reaktivität	Konzentration	Hersteller
<b>Alexa Fluor 488</b>	Ziege	Maus	1:500	Life Technologies
<b>Alexa Fluor 488</b>	Ziege	Kaninchen	1:500	Life Technologies
<b>Alexa Fluor 594</b>	Ziege	Maus	1:500	Life Technologies
<b>Alexa Fluor 594</b>	Ziege	Kaninchen	1:500	Life Technologies

**Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper und die jeweiligen Hersteller für Western Blot und Immunpräzipitation.** Angegebene Konzentrationen beschränken sich auf das jeweilige Experiment.

<b>Antikörper</b>	<b>Spender</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>N-Cadherin</b>	Maus	1:1000	BD Biosciences	610921
<b>S6</b>	Maus	1:1000	Cell Signaling	2317S
<b>pS6</b>	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling	2215S
<b>GAPDH</b>	Maus	1:6000	Abcam	ab8245
<b>HuR</b>	Maus	1:200 (IP) 1:1000 (WB)	Santa Cruz	sc-5261
<b>IgG</b>	Maus	1:400 (IP)	Santa Cruz	sc-2025
<b>cFos</b>	Kaninchen	1:1000	Abcam	ab190289
<b>Fosb</b>	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	2251S
<b>Npas4</b>	Kaninchen	1:500	Activity Signaling	AS-AB18A
<b>MAPK</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9102S
<b>pMAPK</b>	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9101S
<b>Ldlr</b>	Ziege	1:1000	Novus Biologicals	AF2255
<b>Nsdhl</b>	Kaninchen	1:1000	Novus Biologicals	NBP1-83306
<b>Osc</b>	Maus	1:500	Santa Cruz	sc-365129
<b>Mvd</b>	Maus	1:500	Santa Cruz	sc-376975
<b>4E-BP1</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9644S
<b>p4E-BP1</b>	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2855S
<b>NF-YA</b>	Maus	1:200 (ChIP) 1:1000 WB)	Santa Cruz	sc-17753

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Durchführung der zellbiologischen Arbeiten erfolgte unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien unter einer Sterilbank. Die verschiedenen Zelllinien wurden in den jeweiligen Zellkulturmedien in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % (Neuronen bei 8 %) kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig zwei bis drei Mal pro Woche bei einer Konfluenz von 70 bis 90 % gesplittet.

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien**

HeLa Zellen wurden in DMEM inklusive 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Für das Passagieren der adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) gewaschen und durch eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin/EDTA gelöst. Der Verdau durch Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und je nach Bedarf verdünnt auf eine neue Zellkulturflasche inklusive frischem Medium übertragen.

#### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit Einfriermedium (10 % DMSO in Kulturmedium) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert und mit Hilfe von CoolCell® Freezing Containern bei -80 °C eingefroren. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in einen flüssigen Stickstofftank (-180 °C) überführt.

Um die Zellen aufzutauen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, in ein Falcon überführt, zentrifugiert und das Einfriermedium entfernt. Nach Absaugen des Einfriermediums wurde das Zellpellet im jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche respektive Zellkulturschale überführt.

#### **2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahlen**

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde Trypanblau als Indikator der Zellviabilität verwendet. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, während der

Farbstoff die Membran toter Zellen durchdringen kann, wodurch sich diese dunkelblau färben. Zur Zählung wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension und 10 µl Trypanblau gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer überführt, die Zellen aus vier Quadranten gezählt und die Menge der lebenden Zellen der Suspension nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{Durchschnitt der Zellzahl aus 4 Quadranten} * 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4$$

### **2.2.1.4 Kultivierung von primären Neuronen**

Für die Kultivierung der primären Neuronen wurden diese aus dem zerebralen Cortex von Mausembryonen (Stadium E14.5) isoliert und auf Poly-L-Ornithin sowie Laminin beschichteten Zellkulturplatten wie nachfolgend beschrieben kultiviert.

#### **2.2.1.4.1 Beschichtung der Platten**

6-well Platten wurden mit Poly-L-Ornithin in DPBS (15 µg/ml) beschichtet und anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden die Platten mit Laminin in DPBS (2,5 µg/ml) beschichtet und für 2 Stunden bei 37 °C oder über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am Tag der Präparation wurden die Platten erneut zwei Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde das zugehörige Kulturmedium, das aus Neurobasal Medium (97 %), B27 (2 %) und GlutaMAX (1 %) bestand, hinzugefügt und die Platten im Brutschrank bei 37 °C equilibriert (siehe Tabelle 11)

#### **2.2.1.4.2 Vorbereitungen zur Präparation der Maus**

Zur Sterilisation und Equilibrierung der Werkzeuge wurden je zwei Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit DPBS und Ethanol (70 %) und drei Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit DMEM (ohne Zusätze) vorbereitet. Zwei der drei Zentrifugenröhrchen mit DMEM wurden kurz vor der Präparation angewärmt, während das dritte Röhrchen auf Eis gelagert wurde. Zusätzlich wurden vor der Präparation Trypsin/EDTA, Stoppmedium (DMEM, 20 % FBS), DMEM (ohne Zusätze) und das Kulturmedium (Neurobasal, B27, GlutaMAX) im Wasserbad aufgewärmt.

### 2.2.1.4.3 Durchführung der Mauspräparation

Die tragende Maus (Stadium E14.5) wurde durch zerebrale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Bauchdecke mit 70 % Ethanol desinfiziert. Mit einer Pinzette wurde die Bauchdecke angehoben, mittels Schere V-förmig aufgeschnitten und kopfwärts weggeklappt. Anschließend wurden die Embryonen vorsichtig mit einer Pinzette herausgezogen, die Verbindung zum Muttertier am Zusammenstoß der Hörner durchtrennt und in eine Petrischale mit angewärmtem DMEM überführt. Die Embryonen wurden nach Öffnen der Fruchtblase vorsichtig entnommen und mit einer Schere dekapitiert. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurden daraufhin die Schädeldecken mit zwei gebogenen Pinzetten entfernt und das Gehirn freigelegt. Die Hirne wurden anschließend in eine neue Petrischale mit DMEM überführt. Die beiden Hemisphären jedes Gehirns wurden voneinander getrennt und abermals in eine neue Petrischale mit DMEM überführt. Daraufhin wurden die Hirnhäute der Hemisphären entfernt, der zerebrale Cortex isoliert und anschließend in das auf Eis gelagerte Zentrifugenröhrchen mit DMEM überführt.

### 2.2.1.4.4 Isolierung der Neuronen

Nach Vollendung der Cortexpräparation wurde das DMEM aus dem Zentrifugenröhrchen vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde vorgewärmtes Trypsin/EDTA (0,5 ml pro Hirn) hinzugegeben und die Neocortexe für exakt 6 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde nach Ablauf der 6 Minuten mit 15 ml Stoppmedium gestoppt und bei Raumtemperatur für zwei Minuten mit 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 20 ml DMEM überschichtet und erneut unter den gleichen Parametern zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium versetzt und mit einer Pipette ausgiebig resuspendiert, sodass keine Cortexstücke mehr zu sehen waren. Daraufhin wurden weitere 4 ml Kulturmedium in das Zentrifugenröhrchen zugegeben. Nach Zählung der Zellen wurde die Zellsuspension erneut vermischt und  $1,4 \times 10^6$  Zellen in jedes *well* der equilibrierten 6-*well* Platten pipettiert. Die Neuronen wurden bei 37 °C und 8 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Kulturmediums für die Kultivierung der primären Neuronen.**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Kulturmedium</b>	97 % Neurobasal-Medium
	2 % B27-Supplement
	1 % GlutaMAX

### 2.2.1.5 Behandlung mit pharmakologischen Stoffen

#### 2.2.1.5.1 Behandlung der Neurone

Zur Überprüfung von eventuellen Effekten verschiedener Substanzen, wurden primäre Neuronen für gewöhnlich für sechs Tage kultiviert und anschließend mit dem jeweiligen Stoff behandelt. Für die Inhibition von mTOR wurde Temsirolimus (10  $\mu$ M) und später auch Torin1 (500 nM) verwendet. Hierfür wurden nach der Kultivierung für sechs Tage die Hälfte des Kulturmediums der Neuronen entfernt und durch frisches Medium inklusive der jeweiligen Substanz ersetzt. Um zusätzlich zur Inhibition von mTOR einen Effekt auf die RNA- bzw. Proteinstabilität zu erörtern, wurden die Neuronen nach der Behandlung mit DMSO bzw. Temsirolimus zusätzlich mit Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) zur Blockierung der Transkription oder mit Cycloheximid (200  $\mu$ g/ml) zur Blockierung der Translation behandelt. Als Positivkontrolle für den Cholesterol Assay wurde Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (1 mM) verwendet. Um einen potenziellen Effekt einer Aktivierung von mTOR zu überprüfen, wurden die Neuronen mit dem Insulin-like-growth-factor-I (IGF1; 50 – 100 ng/ml) behandelt. Zur Untersuchung einer eventuellen neuronalen Aktivierung nach der Gabe von Temsirolimus vorliegt, wurden die primären Neuronen mit dem Natrium-Kanal-Blocker Tetrodotoxin (TTX; 1  $\mu$ M) behandelt. Um einen Einfluss des MAP-Kinase-Signalwegs (mitogen-activated protein pathway) nach Inhibition von mTOR zu testen, wurden die Neuronen mit dem selektiven Inhibitor U0126 (10  $\mu$ M) behandelt, welcher die Enzyme MEK 1 und 2 des MAP-Kinase-Signalwegs inhibiert.

#### 2.2.1.5.2 IP-Injektionen

Für *in vivo* Experimente wurden 8-12 Wochen alte schwangere NMRI-Mäuse mit Rapamycin behandelt. Hierfür wurden den Mäusen mit Hilfe einer Spritze 10  $\mu$ l Rapamycin (1 mg/kg) oder 10  $\mu$ l DMSO intraperitoneal injiziert. Diese Injektionen erfolgten in Anlehnung an die Arbeit von Tsai und Kollegen entweder einmalig (E16.5)

oder an drei aufeinander folgenden Tagen (E14.5-E16.5) (Tsai et al., 2013). Zusätzlich wurden postnatale Tiere mit Rapamycin und DMSO intraperitoneal injiziert. Hierbei erfolgten die Injektionen der Tiere entweder einmalig im Stadium P2 oder zweimalig in den Stadien P2 und P4.

### **2.2.1.6 Transfektion von HeLa-Zellen**

HeLa Zellen wurden am Vortag in DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin ausgesät (100.000 Zellen pro *well* einer 6-*well* Platte). Zunächst wurden die beiden Mixe für die Transfektion vorbereitet. Mix 1 beinhaltete hierbei ein Gemisch aus 11  $\mu$ l OptiMEM und 5  $\mu$ l Oligofectamin (Angaben pro *well*). Mix 2 bestand aus 175  $\mu$ l OptiMEM und 10  $\mu$ l der jeweiligen siRNA (20  $\mu$ M) gegen HuR pro *well*. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde anschließend die benötigte Menge an Mix 1 zu Mix 2 pipettiert und für weitere 15 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden 200  $\mu$ l des siRNA-Oligofectamin-Gemischs auf die Zellen pipettiert und für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für das weitere Vorgehen entsprechend geerntet.

### **2.2.1.7 Transfektion von primären Neuronen**

Primäre Neuronen sind durch ihre Eigenschaft, sich nicht zu teilen, schwieriger zu transfizieren. Daher wurde hierfür ein bereits etablierter Ansatz mit Hilfe von Accell siRNAs verfolgt. Der Mechanismus der Reaktion dieser speziellen siRNAs ist nicht bekannt, es könnte sich jedoch hierbei um Oligonukleotide handeln, die mit Lipiden angereichert sind. Zur Transfektion wird kein zusätzliches Transfektionsreagenz benötigt.

Für die Transfektion wurde ein Pool aus vier siRNAs (1  $\mu$ M) gegen *cFos* auf die Zellen pipettiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zusätzlich mit Temsirolimus behandelt. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und für eine Proteinisolation weiterverarbeitet.

## **2.2.2 Isolierung der Proteine aus Zellen**

Um die zu untersuchenden Proteine analysieren zu können, wurden die primären Neuronen und Zelllinien geerntet. Im Vorfeld wurde ein Aliquot des Protein-Lysis-Puffers Magic-Mix aufgetaut und mit 1 % Mercaptoethanol versetzt (siehe Tabelle 12). Für die Proteinisolation wurde das Medium der *wells* entfernt, die *wells* mit 2 ml DPBS

gewaschen und mit 1 ml frischem DPBS überschichtet. Mittels Zellschaber wurden die Zellen vom Boden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Falcon überführt und bei 200 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 – 100 µl Magic Mix, je nach Größe des Pellets, aufgenommen. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze wurde die viskose Suspension auf eine QIAshredder-Säule übertragen, bei 11.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und der Durchfluss auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bis zur Analyse via Western Blot bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Protein-Lyse-Puffers „Magic Mix“.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Magic Mix</b>	48 % Harnstoff
	14 mM Tris pH 7,5
	8,7 % Glycerin
	1 % SDS
	1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette
	in dH <sub>2</sub> O

### 2.2.3 Isolierung der Proteine aus Gewebe

Nach Tötung des Muttertiers durch cervikaler Dislokation, wurden die Cortexe der Embryonen analog zum Vorgehen der Isolation der Neuronen (beschrieben unter 2.2.1.4.3) isoliert. Die Cortexe wurden in Magic Mix inklusive 1 % Mercaptoethanol überführt und mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert. Im Folgenden wurde das Gemisch für 2 Stunden bei 8 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch auf eine QIAshredder-Säule überführt und bei 11.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Isolation der RNA wurde das High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche verwendet. Das geerntete Zellpellet wurde in 200 µl DPBS resuspendiert, mit 400 µl

Lysis-/Binding Puffer versetzt und anschließend gründlich für 15 Sekunden gevortext. Für die RNA-Gewinnung nutzt man die spezifischen Bindeeigenschaften einer Glasfasermembran und die Mikrosäulenzentrifugation. Zunächst wurde das Lysat (600 µl) auf die Membran der Säule des High Pure Filter Röhrchens pipettiert und für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Um Reste kontaminierender DNA abzubauen, erfolgte anschließend der DNase-Verdau durch Zugabe von 100 µl DNase I (Roche), hergestellt aus 10 µl DNase Stocklösung und 90 µl DNase I Incubation Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Verdau wurde dieser mit 500 µl Wash Buffer 1 gestoppt und anschließend für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Um die RNA von anderen Begleitsubstanzen und zellulären Bestandteilen zu befreien, wurden 500 µl Wash Buffer II hinzugefügt und wiederum für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden noch einmal 200 µl Wash Buffer II zugegeben und diesmal für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Beide Male kann die Flüssigkeit im „Collection Tube“ anschließend verworfen werden. Zuletzt folgte das Eluieren der RNA mit 50-100 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm. Die so gewonnene RNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.2.5 Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe**

Nach Tötung des Muttertiers durch cervikaler Dislokation, wurden die Cortexe der Embryonen analog zum Vorgehen der Isolation der Neuronen (beschrieben unter 2.2.1.4.3) isoliert. Die Cortexe wurden über Nacht in 100 µl RNAlater bei -80°C gelagert. Zur Isolierung der RNA wurde zunächst 100 µl Trizol auf das Gewebe pipettiert und anschließend mit einem Homogenisator zerkleinert. Im Anschluss wurden weitere 900 µl Trizol auf das Gewebe überführt. Nach Herstellung einer homogenen Suspension mit Hilfe eines Vortexers wurde das Gewebegemisch für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform auf das Gemisch pipettiert, für etwa 10 Sekunden geschüttelt und für weitere 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 12.000 g für 15 Minuten bei 4 °C. Die obere, klare Phase wurde in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit 500 µl kaltem Isopropanol überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde das Gefäß bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen und erneut bei 12.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach einer weiteren Waschung mit 70 % kaltem Ethanol wurde das Pellet bei Luft getrocknet

und im Anschluss mit 50 µl RNA Elutionspuffer (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend entweder sofort verwendet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und RNA

Die Reinheit, Menge und Integrität der Protein- und RNA-Proben wurden mittels NanoDrop One-Spektrophotometer gemessen. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die gewünschten Proteine zu untersuchen wurden die Proteinlysate mittels SDS-Page aufgetrennt und nach anschließender Western Blot-Analyse quantifiziert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurden ausschließlich SDS-Gele nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Hierfür wurde ein 10 %iges Trenngel entsprechend der Tabelle 14 vorbereitet und in die Elektrophorese-Apparatur überführt. Durch die Überschichtung des Trenngels mit Isopropanol, wurde eine korrekte Polymerisation des Gels gewährleistet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das vorbereitete Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Daraufhin wurde ein Kamm in das Sammelgel eingeführt. Zur elektrophoretischen Separation wurden 20-30 µg der Proteinproben (maximal 25 µl) mit 5 µl Laemmli sample Puffer (siehe Tabelle 13) 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; siehe Abb. 7 B) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für etwa 45 Minuten.

**Tabelle 13: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der SDS-Page.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Laemmli sample Puffer	2 x Magic Mix 0,004 % Bromphenolblau
10 % APS	1 g Ammonium persulfate 10 ml dH <sub>2</sub> O

Reservoir Puffer	6 g Trisbase 28,8 g Glycerin 2 Liter dH <sub>2</sub> O 2 g SDS
10 % SDS	10 g SDS 90 ml dH <sub>2</sub> O
0,5 M Tris pH 6,8	30,275 g Trisbase konzentriertes HCl zum pH einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml mit dH <sub>2</sub> O
1,5 M Tris pH 8,8	90,825 g Trisbase konzentriertes HCl zum pH einstellen Gesamtvolumen auf 500 ml mit dH <sub>2</sub> O

**Tabelle 14: Zusammensetzung der verwendeten Gele bei der SDS-Page.**

	<b>10% Trenngel [μL]</b>	<b>5% Sammelgel [μL]</b>
dH <sub>2</sub> 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

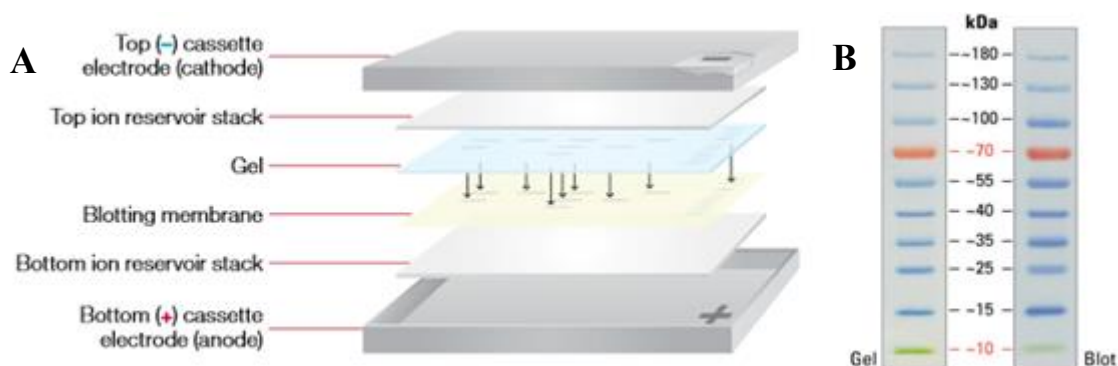
### 2.2.8 Western Blot

Nach erfolgreicher Auftrennung der Proteine wurden die Gele auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierfür wurden die kommerziellen

TransBlot Turbo Transfer Packs (Bio-Rad) verwendet. Entsprechend Abbildung 7A wurde die Western Blot Kammer aufgebaut und die Proteine je nach Größe für 5-15 Minuten bei 25 V und 2,5 A transferiert (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System).

**Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Puffer beim Western Blot.**

Puffer	Zusammensetzung
PBS-T	1 ml Tween 2 PBS-Tabletten Auf 1 Liter dH <sub>2</sub> O
Blocking Reagenz (Milch)	2,5 g Milchpulver Auf 50 ml PBS-T
Blocking Reagenz (BSA)	1 g BSA Auf 50 ml PBS-T



**Abbildung 7: Aufbau der Western-Blot-Kammer und der verwendete Längenstandard.** A) Aufbau der Western-Blot-Kammer zur Übertragung der Proteine des SDS-Gels auf die PVDF-Membran. B) Verwendeter Längenstandard PageRule™ Prestained Protein Ladder™. Quellen: <http://www.bio-rad.com/>; [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

Nach dem Blotten wurde die Membran in 50 ml Falcons überführt. Die folgenden Inkubations- und Waschschrte wurden stets auf einem Rollenmischer vollzogen. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden mittels 15 ml Blocking Reagenz für 30-60 Minuten blockiert (siehe Tabelle 15). Anschließend wurden 12 ml des Blocking Reagenzes entfernt und die Membran mit den zugehörigen primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 10). Nach drei fünfminütigen

Waschschritten mit 15 ml PBS-T wurde der sekundäre Antikörper in 3 ml Blocking Reagenz zusammen mit den Membranen bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 15). Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Proteine mittels einer Elektrochemilumineszenzreaktion (Western Lightning® Plus ECL Kit, Perkin Elmer) und dem ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) visualisiert. Die Quantifizierung der Banden wurde mit Hilfe der beiden Softwares ImageJ und Microsoft Excel vollzogen. Hierbei wurden die Werte über eine Division durch die korrespondierenden GAPDH-Werte normalisiert.

### 2.2.9 Reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription beschreibt die Umkehrung der Transkription, das heißt die Übersetzung der Sequenzabfolge einer RNA in eine komplementäre DNA (cDNA). Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym reverse Transkriptase. Hierfür wurde die gewünschte Menge Gesamt-RNA (500 – 1000 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. Unter den folgenden Bedingungen wurde die cDNA-Synthese gestartet (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Bedingungen der cDNA-Synthese der Gesamt-RNA.**

Step	Temperatur	Zeit	
Hold	37° C	15 Minuten	Reverse Transkription
Hold	85° C	5 Sekunden	Hitzeinaktivierung
Hold	4 ° C	∞	Lagerung

### 2.2.10 Quantifizierung der cDNA mittels quantitativer PCR (qPCR)

Für die Quantifizierung der unterschiedlichen cDNA-Level wurden diese über eine qPCR analysiert. Die Methode der quantitativen Real-time PCR beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR, welche jedoch während eines PCR-Zyklus mittels Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Hierbei

nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der DNA-Farbstoff SYBR Green (SYBR Premix Ex Taq, Takara) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch diese fluoresziert und dadurch nachweisbar ist. Zur Bestimmung der ursprünglichen DNA-Konzentration wurde der CT-Wert (Cycle Treshold) genutzt, der den erstmaligen signifikanten Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum Hintergrund beschreibt. 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 der verschiedenen Zielgene 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 dH<sub>2</sub>O (Angaben pro *well* einer 96-*well*-Platte) angefertigt. Nun wurde 2 µl der verdünnten cDNA in drei technischen Replikaten in die *wells* vorgelegt und anschließend 8 µl des Mastermixes hinzugegeben. Nach Versiegelung der Platte mit einer Folie (Absolute qPCR Plate Seal) und Zentrifugation, wurde die Platte in das StepOnePlus™ Real-Time PCR System überführt und die qRT-PCR mit folgenden Parametern gestartet (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: Bedingungen der qRT-PCR.**

Step	Temperatur	Zeit	
Hold	95 °C	30 sec	DNA-Denaturierung
CYCLE (40 cycles)	94 °C	15 sec	DNA-Denaturierung
	60 °C	30 sec	Primerannealing
	72 °C	30 sec	Elongation
CYCLE (-0,5°C nach jedem Cycle)	60 °C	15 sec	Schmelzkurve
	95,5 °C	15 sec	

### 2.2.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)-qPCR

Bei der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) handelt es sich um eine Technik zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen, um eine mögliche transkriptionelle Regulation zu untersuchen. DMSO oder Temsirolimus behandelte Neuronen wurden pelletiert, in kaltem PBS resuspendiert und anschließend in 1 % Formaldehyd (gelöst in DPBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden in 140 mM RIPA-Puffer (siehe Tabelle 18) resuspendiert und für 20 Zyklen auf einem Bioruptor Pico (Diagenode) mit Ultraschall behandelt. Nach der Beschallung wurden die Proben bei 14.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Hierbei wurde das Input-Material separat gesammelt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte wurden über Nacht mit 1 µg NF-YA respektive IgG-Antikörper (beide Santa Cruz) bei 4°C auf einem Überkopfmischer inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl von blockierten Protein A und G Dynabeads (Diagenode) zu den Proben pipettiert und für weitere drei Stunden inkubiert. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magnettracks von den Proben getrennt und nach folgendem Schema gewaschen: Einmalig mit 140 mM RIPA-Puffer, vier Mal mit 250 mM RIPA-Puffer und zwei Mal mit TE-Puffer (siehe Tabelle 18). Anschließend wurden die Proben mit RNase (New England Biolabs) behandelt und nach Zugabe von Proteinase K für 12 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Methode die DNA extrahiert. Nach der Präzipitation und Pelletierung wurde die DNA in 20 µl TE Puffer gelöst. Die Proben wurden mittels qRT-PCR gemessen, wobei das fluoreszierende Signal der amplifizierten DNA zum Input der jeweiligen Probe normalisiert wurde.

**Tabelle 18: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der Chromatin-Immunpräzipitation.**

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (140 mM)	10 mM Tris-Cl, pH 8 140 mM NaCl 0,1 mM EDTA, pH 8 1 % Triton X-100 0,1 % SDS

RIPA-Puffer (250 mM)	10 mM Tris-Cl, pH 8 250 mM NaCl 0,1 mM EDTA, pH 8 1 % Triton X-100 0,1 % SDS
TE Puffer	10 mM Tric-Cl, pH 8 0,1 mM EDTA, pH 8

### 2.2.12 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Um einen Effekt von mTOR auf die Transkription der primären Neuronen zu überprüfen, wurde das Transkriptom der Zellen nach einer Behandlung mit DMSO und Temsirolimus für 5 respektive 24 Stunden untersucht.

#### 2.2.12.1 Library

Nach dem Ernten der Zellen wurde die Reinheit, Menge und Integrität der RNA mittels Bioanalyzer überprüft und die RNA für eine Library vorbereitet. Für die Library wurde das QuantSeq 3' mRNA-Seq REV Kit von Lexogen verwendet. Mit Hilfe der Konzentrationsbestimmung wurden 500 ng RNA für die Library verwendet. Unter Zugabe von dH<sub>2</sub>O wurde das Volumen der RNA auf 5 µl gebracht und anschließend mit 5 µl First Strand cDNA Synthesis Mix 1 vermischt. Nach Denaturierung bei 85°C für 3 Minuten wurde bei einer Temperatur von 42°C ein Mix aus First Strand cDNA Synthesis Mix 2 und Enzyme Mix auf die Proben pipettiert und für 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Die nun entstandene cDNA wurde von restlicher RNA mittels RNA Removal Solution unter Inkubation für 10 Minuten bei 95°C befreit. Für die Synthese des zweiten Strangs wurden 10 µl des Second Strand Synthesis Mix 1 zu den Proben pipettiert und für 1 Minute bei 98°C inkubiert. Nach schrittweiser Abkühlung von 0,5° C pro Sekunde auf 25 °C wurde der Ansatz für weitere 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe einer Mischung aus Second Strand Synthesis Mix 2 und Enzym Mix 2 pro Reaktion wurde der Ansatz erneut für 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mittels Beads aufgereinigt. Nach Zugabe von 16 µl Purification Beads und anschließender 5-minütiger Inkubation wurden die Proben auf ein Magnettrack gestellt. Der klare Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 40 µl Elution Buffer auf die

Proben gegeben und gemischt. Nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 56  $\mu\text{l}$  Purification Solution auf die Proben pipettiert und für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand erneut mittels Magnettrack entfernt. Daraufhin wurden die Beads zwei Mal mit 80 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden 22  $\mu\text{l}$  Elution Buffer auf die Proben pipettiert, inkubiert und mittels Magnettrack von den Beads separiert. Der aufgereinigte Überstand inklusive cDNA wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Als Nächstes wurden die benötigten Zyklen für die darauffolgende PCR anhand einer qPCR bestimmt. Hierfür wurden 1,7  $\mu\text{l}$  der jeweiligen cDNA mit 7  $\mu\text{l}$  PCR Mix, 5  $\mu\text{l}$  P7 Primer, 1  $\mu\text{l}$  Enzyme Mix (PCR Add-On Kit für Illumina) 13,8  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 1,5  $\mu\text{l}$  SYBR Green (Takara) auf eine 96-well Platte pipettiert.

**Tabelle 19: Thermocycler-Programm für qRT-PCR (RNA-Sequenzierung).**

Step	Temperatur	Zeit	
Hold	98 °C	30 sec	DNA-Denaturierung
CYCLE (45 cycles)	98 °C	10 sec	DNA-Denaturierung
	65 °C	20 sec	Primerannealing
	72 °C	30 sec	Elongation
Hold	72 °C	1 min	Elongation
Hold	10 °C	For ever	Storage

Für die Index-PCR wurde zunächst ein Mastermix aus 7  $\mu\text{l}$  PCR-Mix und 1  $\mu\text{l}$  Enzyme Mix 3 vorbereitet. Anschließend wurden 8  $\mu\text{l}$  des Mastermixes zu der eluierten Library gegeben. Daraufhin wurden 5  $\mu\text{l}$  eines i7 Index-Primer aus einer mitgelieferten, versiegelten 96-well Platte zu der Probe hinzugefügt. Nach Mischen und Abzentrifugieren der Proben wurde die PCR mit den in Tabelle 19 beschriebenen Konditionen gestartet.

Abschließend wurde die finale Library nochmals mit Beads aufgereinigt. Nach Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  Beads und anschließender 5-minütiger Inkubation wurden die Beads mittels Magnettrack von der Probe separiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 30  $\mu\text{l}$  Elution Buffer und 30  $\mu\text{l}$  Purification Solution zu den Proben pipettiert. Nach

Inkubationsschritten wurde der Überstand erneut von den Beads entfernt. Im Anschluss wurden die Proben zweimalig mit 80 % Ethanol gewaschen und daraufhin luftgetrocknet. Abschließend wurden 20 µl Elution Buffer auf die Proben gegeben, für 5 Minuten inkubiert und der Überstand nach Trennung von den Beads in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die finale Library wurde anschließend mittels Bioanalyzer quantifiziert.

#### **2.2.12.2 Sequenzierung**

Im Folgenden wurden die Proben für die Sequenzierung vorbereitet. Zunächst wurde ein Pool aller Proben angefertigt, sodass jede Probe in einem definierten Volumen eine Konzentration von 2 nM aufwies. Für die weitere Vorgehensweisen beziehungsweise die Denaturierung der Library wurde 0,2 N NaOH hergestellt, welche im Verhältnis von 1:1 mit der Library vermischt wurde. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurden 10 µl Tris-HCl (200 mM; pH 7) hinzugefügt. Mittels HT1-Puffer wurde die denaturierte Library nun auf 20 pM verdünnt. Für die verwendete Library wird eine Konzentration von 2,5 pM empfohlen, die mittels HT1-Puffer abermals verdünnt wurde. Der mitgelieferte Custom Primer von Lexogen wurde ebenfalls mittels HT1-Puffer auf eine Konzentration von 0,3 µM bei einem Volumen von 2 ml verdünnt. Anschließend wurden Library und Primer auf die High Output Reagent Cartridge v2 (75 cycles; Illumina) geladen. Nach Vorbereitung der Flow Cell (Illumina) wurde der Sequenzier-Lauf auf einem NextSeq 550-Gerät (Illumina) gestartet.

#### **2.2.13 Assay for Transposase-Accessible Chromatin-Sequencing (ATAC-Seq)**

Mit Hilfe des ATAC-Seq kann man genomweite Änderungen in der Zugänglichkeit von Chromatin überprüfen. Hierfür wurden primäre Neuronen mit DMSO oder Temsirolimus für 5 Stunden behandelt, geerntet, 50.000 Zellen pelletiert, in kaltem Lyse-Puffer (siehe Tabelle 20) resuspendiert und im Anschluss bei 750 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Direkt nach der Zellpräparation wurde das Pellet mit dem Transposase Reaktionsmix (siehe Tabelle 20) resuspendiert. Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 37°C. Nach der Transposition wurden die Proben mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Im Anschluss wurde die Library mit Hilfe des 1x NEBnext PCR Master Mix und dem Custom Nextera PCR Primer 1 und 2 (1,25 µM) mit Hilfe der in Tabelle 21 beschriebenen PCR-Konditionen amplifiziert. Nach der PCR

wurden die Proben erneut mittels MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt. Um Primerdimere zu entfernen wurden die Proben mit Hilfe der AMPure Beads XP (Beckman Coulter) mit einem Verhältnis von 0,9:1 von Beads zu Proben weiter gereinigt. Die Proben wurden im Anschluss mit Hilfe des Bioanalyzers (Agilent Technologies) analysiert und mittels HiSeq 2500 (Illumina) sequenziert.

**Tabelle 20: Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer bei der ATAC-Sequenzierung.**

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM NaCl 3 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 % IGEPAL CA-630
Transposase Reaktionsmix	25 µl TD-Puffer 2,5 µl Transposase 22,5 µl Nucleasefreies Wasser

**Tabelle 21: Thermocycler-Programm für PCR (ATAC-Sequenzierung).**

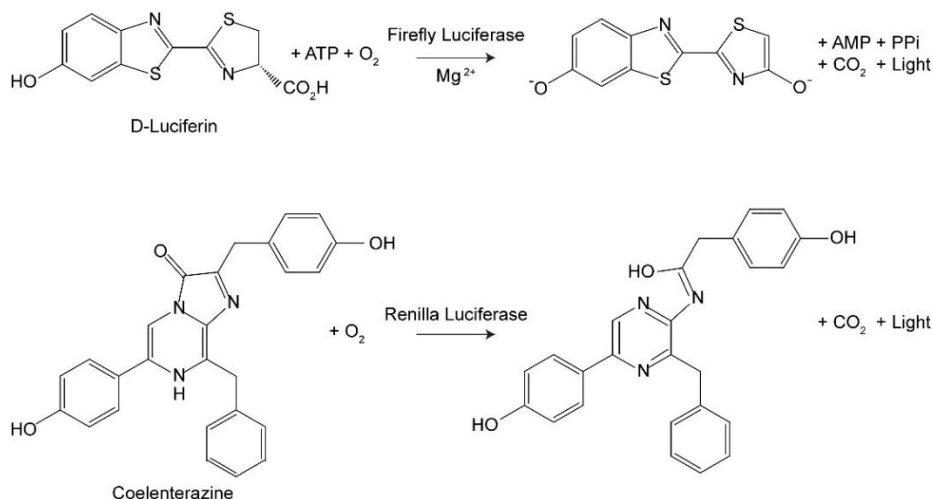
Step	Temperatur	Zeit	
Hold	72 °C	5 min	
Hold	98 °C	30 sec	DNA-Denaturierung
CYCLE (12 cycles)	98 °C	10 sec	DNA-Denaturierung
	63 °C	30 sec	Primerannealing
	72 °C	1 min	Elongation

### 2.2.14 Cholesterol Assay

Zur Überprüfung eines potenziell veränderten Cholesteringehalts der Neuronenkultur wurde mit Hilfe des Amplex™ Red Cholesterol Assays die Cholesterinmenge untersucht. Hierfür wurden die primären Neuronen mit DMSO, Temsirolimus (je 48 Stunden) oder Cyclodextrin (eine Stunde) behandelt. Cyclodextrin dient als Positiv-Kontrolle, da es Cholesterol aus Zellmembranen extrahieren und damit reduzieren kann. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zellschaber geerntet und das Pellet mit 500 µl DPBS resuspendiert. Für den Assay wurde zunächst aus den Reagenzien des Kits eine 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hergestellt, was als Positivkontrolle diente. Im Anschluss wurden pro Sample 20 µl der Zellsuspension mit 30 µl 1 x Reaction Buffer vermischt. Neben der Positivkontrolle wurden in Duplikaten die unterschiedlichen Zellsuspensionen in eine 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde die Amplex Working-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 1,61 ml Reaction Buffer, 25 µl Amplex Red Solution, 16,6 µl HRP Solution, 16,6 µl Cholesterol Oxidase und 1,66 µl Cholesterol Esterase gemischt. Hiervon wurden 50 µl zu den bereits geladenen wells pipettiert. Im Anschluss wurden die 96-well Platte bei 37°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde der Cholesteringehalt der unterschiedlichen Proben mittels des Multi-mode Microplate Reader FLUOstar Optima (BMG Labtech) unter der Verwendung der Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionsdetektion von 590 nm gemessen.

### 2.2.15 Luciferase Assay

Um eine potenzielle posttranskriptionelle Regulation von N-Cadherin durch mTOR zu untersuchen wurde ein dualer Luciferase-Assay durchgeführt. Hierdurch lassen sich zwei verschiedene Reporterenzyme innerhalb einer Probe simultan bestimmen. Als Reportergene dienten die Firefly und Renilla Luciferasen. Diese Luciferasen können Reaktionen katalysieren, wodurch biolumineszierende Effekte entstehen. Die Firefly-Aktivität bezieht sich auf den Effekt der tatsächlichen experimentellen Bedingungen, während Renilla als Kontroll-Reporter dient. Bei Firefly kommt es bei einer von ATP und Magnesium abhängigen Reaktion zur Entstehung von Luciferin, welches in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert. Das angeregte Oxyluciferin kehrt dann unter Freisetzung von Licht in den Grundzustand zurück. Eine schematische Darstellung dieser Reaktion ist in Abbildung 8 zu sehen.



**Abbildung 8: Biolumineszenzreaktionen**, die durch die Firefly- und die Renilla-Luciferase katalysiert werden.

Zur Untersuchung einer posttranskriptionellen Regulation von Ncad wurden vier verschiedene Konstrukte verwendet (siehe Tabelle 7). Für den Versuch wurden primäre Neuronen in einer 24-well-Platte für sechs Tage kultiviert, mit DMSO respektive Temsirolimus behandelt und anschließend mit den verschiedenen Konstrukten und dem Renilla-Plasmid (pRL) kotransfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamin 2000. Bei dieser Methode wird ein Vektor durch Einschluss von Liposomen in die zu transfizierenden Zellen eingeschleust. Für die Transfektion wurden zum einen pro *well* 25 µl OptiMEM und 2,5 µl Lipofectamin (Mix 1) und zum anderen 25 µl OptiMEM, 100 ng pRL und 200 ng des jeweiligen Konstrukts (Mix 2) gemischt. Das Experiment erfolgte stets in Triplikaten. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der jeweilige Ansatz auf die Neuronen übertragen.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Neuronen geerntet und gemessen. Zur Messung von Firefly wurde ein etablierter hauseigener Puffer verwendet (siehe Tabelle 22). Für Renilla wurde das kommerzielle erworbene Produkt Renilla Luciferase Assay System (Promega) verwendet.

Die Neuronen wurden von dem Kulturmedium befreit und anschließend mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Luciferase Assay Lyse Puffer (im Kit enthalten) auf die Neuronen pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Für die Messung der Luciferaseaktivität wurden 20 µl der jeweiligen transfizierten Zellen zum einen für die Firefly und zum anderen für die Renilla-Messung in eine neue Platte

pipettiert. Über das Luminometer (Centro LB 960 Luminometer, Berthold Technologies) wurden die jeweiligen Puffer zu den Proben gegeben und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen.

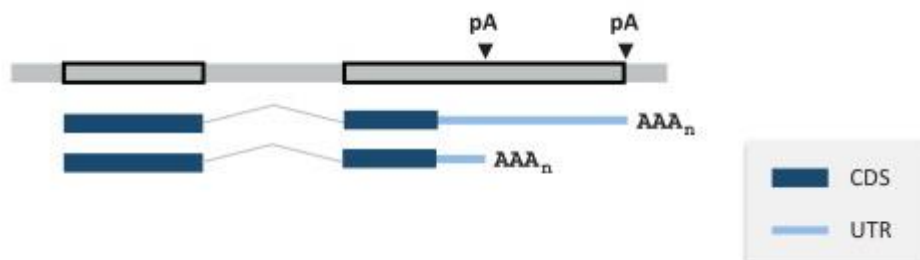
**Tabelle 22: Zusammensetzungen der eingesetzten Bestandteile beim Luciferase-Assay.**

Luciferase Assay	Bestandteile
TRIS-P 100 mM	0,61 g TRIS 50 ml ddH <sub>2</sub> O pH = 7,8
Magnesiumsulfat 100 mM	0,6 g MgSO <sub>4</sub> 50 ml ddH <sub>2</sub> O
ATP 2 mM	1 g ATP 100 mM 18,15 ml ddH <sub>2</sub> O pH = 7,5
Luciferin	10 mg Luciferin 33 ml ddH <sub>2</sub> O
Firefly Luciferase Enzym Mix	25 mM TRIS-P 10 mM MgSO <sub>4</sub> 2 mM ATP 50 µM Luciferin Auf 50 ml ddH <sub>2</sub> O auffüllen

### 2.2.16 3' Rapid amplification of cDNA-ends (3'RACE)

Um die Expression der unterschiedlich langen 3'UTRs von Ncad nach einer Inhibition von mTOR zu bestimmen, wurde das 3'RACE angewendet. Im Genauen wurde hier überprüft welches Poly-A-Signal für die Expression von Ncad verwendet wird und ob sich dies durch eine Inhibition von mTOR verändert (schematische Darstellung siehe Abb. 9).

Bei dieser Methode wird mittels eines oligodT-Primers inklusive angehängtem Anker ein cDNA-Produkt synthetisiert, welches sich durch einen genspezifischen 5'Primer und einen 3'Ankerprimer vervielfältigen lässt. Um zu überprüfen, ob es sich bei den amplifizierten Abschnitten um den 3'UTR von Ncad handelt, wurde das PCR-Produkt in den pGEM-T Easy Vektor ligiert und anschließend transformiert. Nach anschließender Kolonie-PCR und Mini-Prep wurden die verschiedenen Proben sequenziert.



**Abbildung 9: Alternative Polyadenylierungsstellen (pA = polyadenylation sites) eines Gens.** Es wird ein hypothetisches Gen gezeigt, bei dem sich zwei Polyadenylierungsstellen im 3'Exon befinden. Die graue Linie beschreibt die genomische DNA, während die blauen Linien zwei unterschiedliche mRNAs zeigen. Die Codierungssequenz (CDS) und die nicht translatierte 3' Region (3'UTR) sind als dicke bzw. dünne blaue Linien dargestellt. AAA<sub>n</sub> zeigt den PolyA-Schwanz an (verändert nach Tian & Manley, 2013).

Primäre Neuronen wurden wie bereits beschrieben mit DMSO oder Temsirolimus behandelt und nach 24 Stunden geerntet. Nach Isolation der RNA wurde mit Hilfe eines Poly(A) Tailing Kits (New England Biolabs) eventuell verkürzt vorliegende 3'UTRs vor vorzeitigem Abbau durch Exonukleasen geschützt. Hierbei wurden 15 µl der isolierten RNA, 2 µl des 10X E.coli Poly(A) Polymerase Reaction Puffer, 2 µl ATP (10 mM) und 1 µl E. coli Poly(A) Polymerase gemischt, für 30 Minuten bei 37° C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 0,8 µl EDTA (0,25 M) gestoppt. Daraufhin wurde die behandelte RNA mit einem speziellen OligodT Primers inklusive einer Ankers Sequenz (siehe Tabelle 6) mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Scientific) in eine cDNA umgewandelt. Hierfür wurden 1000 ng RNA mit 20 pmol des OligodT-Ankerprimers vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 4 µl Reaction Buffer (5 x), 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µL) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 42°C in einem PCR-Cycler inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 70°C gestoppt. Im Anschluss wurden die unterschiedlichen Fragmente mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Hierfür wurden pro Reaktion 18,5 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10X Advantage 2 PCR Buffer, 0,5 µl dNTP (10 mM), 1 µl Ncad spezifischen forward Primer (Ncad-3RACE Sequenz Tabelle 2.8), 1 µl

Anker reverse Primer (siehe Tabelle 6), 1 µl cDNA und 0,5 µl 50 x Advantage 2 Polymerase Mix gemischt und schließlich im PCR-Cycler amplifiziert (siehe Tabelle 23). Anhand eines Agarosegels wurde die Intensität und Größe der Banden überprüft. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Banden des Agarosegels um Produkte des 3'UTRs von Ncad handelt, wurden im Folgenden die Produkte der PCR in den pGEM-T Easy Vektor (Promega) ligiert. Pro Ansatz wurden 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer, 3 µl PCR Produkt, 1 µl pGEM-T Easy Vector (50 ng) und 1 µl T4 DNA-Ligase vermischt und über Nacht bei 16° C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ligations-Produkte transformiert. Hierfür wurden kompetente E. coli Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 µl Ligationsansatz wurden die Röhren vorsichtig geschwenkt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock wurden die Röhren erneut für zwei Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl vorgewärmtes LB-Medium (Tabelle 24) zu den Proben hinzugefügt und für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze mittels Impföse auf vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mittels Kolonie-PCR eine Auswahl an Proben zur Sequenzierung bereitgestellt. Hierfür wurden gewachsene Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in ein vorbereitetes PCR-Tube getaucht und anschließend in ein Röhren mit 3 ml LB-Medium inklusive Ampicillin überführt. Der PCR-Ansatz beinhaltet 17,5 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl Reaktionspuffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTP, 1 µl forward M13 Primer, 1 µl reverse M13 Primer (Primerliste siehe 2.6) und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (Axon Labortechnik). Nach anschließendem Agarosegel wurden die für die geeigneten PCR-Produkte äquivalenten LB-Medium-Röhren am nächsten Tag mittels Miniprep aufgereinigt. Hierfür wurden 1,5 ml Medium in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 6.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde mittels 100 µl P1-Puffer aus dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) das Pellet gelöst. Nach Zugabe von 100 µl P2-Puffer, mehrmaligem Invertieren und einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden schließlich 100 µl P3-Puffer auf die Proben pipettiert. Nach Vortexen und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 13.500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhren mit vorgelegtem Ethanol (100 %) überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.500 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 150 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13.500 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 50°C im Heizblock getrocknet. Die aufgereinigte

DNA wurde mittels 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Im Anschluss wurden die Proben mittels der Sanger-Methode sequenziert (GATC).

**Tabelle 23: Thermocycler-Programm für PCR (3'RACE).**

Step	Temperatur	Zeit	
Hold	95 °C	1 min	DNA-Denaturierung
CYCLE (30 cycles)	95 °C	30 sec	DNA-Denaturierung
	68 °C	1 min	Annealing + Elongation
Hold	68 °C	1 min	Elongation
Hold	10 °C	For ever	Storage

**Tabelle 24: Zusammensetzung des LB-Mediums für die Bakterienkultur.**

Kulturmedium	Bestandteile
LB-Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Trypton 10 g NaCL Auf 1 Liter mit dH <sub>2</sub> O auffüllen pH 7 autoklavieren

### 2.2.17 Immunfärbung

Für eine Visualisierung von N-Cadherin in den primären Neuronen wurden die Zellen auf Deckgläschen in einer 12-well Platte ausgesät. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus, wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit DBPS mittels 4 % PFA fixiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurden die Platten dreier Mal mit DPBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm im Kühlschrank aufbewahrt.

Für das weitere Vorgehen wurden die fixierten Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht. Hierfür wurde neben den zu untersuchenden Proteinen auch die Zellkerne mittels Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet DNA und emittiert nach der Anregung durch UV-Licht im Spektrum von Blau bis Cyan. Die Proteine wurden mit primären Antikörpern markiert, die wiederum von sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern gebunden werden und unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können.

Die nach der Fixierung im Kühlschrank aufbewahrten Platten wurden von DPBS befreit und für 10 Minuten in 0,2 % Triton X-100 in DPBS bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschstritten mit DPBS wurden die Zellen für 20 Minuten in 2 % Sheep Serum in DPBS geblockt (siehe Tabelle 29). Je nach Färbung wurden nun 50 µl 2 % Sheep Serum in DPBS mit 0,5 µl primärem Antikörper (Tabelle 8) pro Deckgläschen vermischt. 40 µl davon wurden pro Deckgläschen auf einen mit Parafilm überzogenen Deckel einer 6-well-Platte pipettiert. Jedes Deckgläschen wurde nun vorsichtig aus den *wells* gehoben und mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt. Nach 60-minütiger Inkubationszeit wurden die Deckgläschen zurück in die *wells* transferiert und drei Mal mit DPBS gewaschen. Für den sekundären Antikörper wurde das Vorgehen wiederholt. 50 µl 2 % Sheep Serum in DPBS wurden mit 0,5 µl sekundärem Antikörper pro Reaktion vermischt und 40 µl davon auf einen Deckel mit Parafilm gegeben. Nach Übertragung der Deckgläschen wurden die Zellen nun für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Deckgläschen erneut drei Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Fluoromount Mounting Medium mit 1 µl Hoechst-Farbstoff vermischt und 10 µl davon auf SuperFrost Objektträger pipettiert. Das Mounting Medium dient der Befestigung des Deckgläschens auf dem Objektträger, während der Hoechst-Farbstoff die DNA der Zellen bindet. Die Zellen wurden möglichst blasenfrei auf den Tropfen überführt und bis zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop im Kühlschrank aufbewahrt.

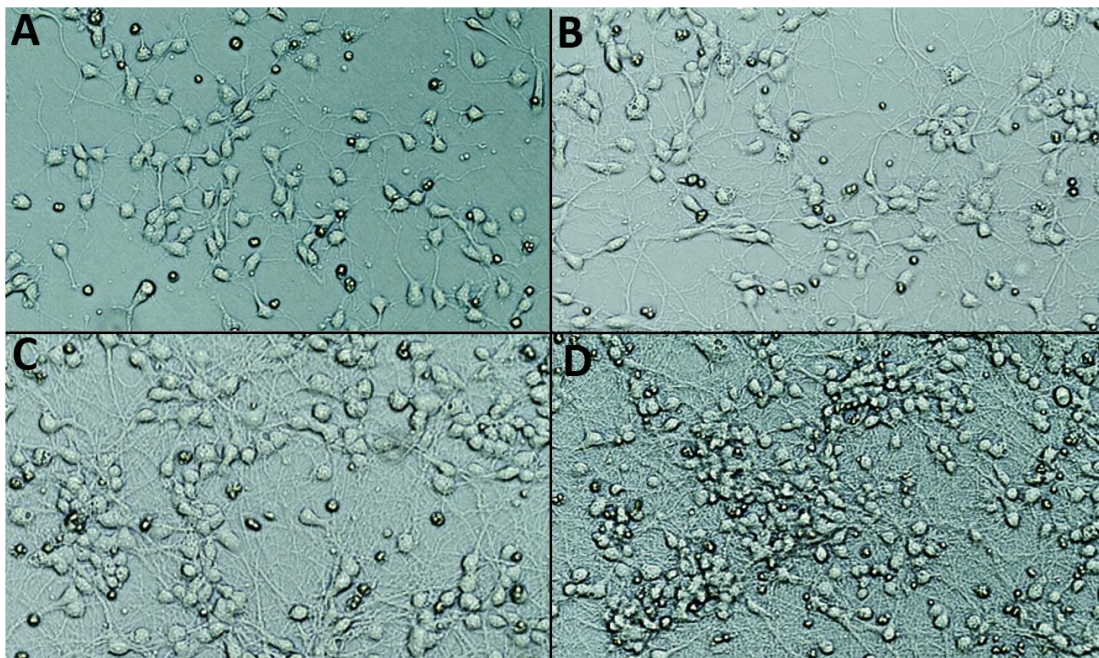
**Tabelle 25: Verwendete Puffer bei der Immunfärbung.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Blocking Buffer</b>	0,2 % Triton-X in PBS
	2 % Sheep Serum
<b>Washing Buffer</b>	0,2 % Triton-X in PBS

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kultivierung von primären Neuronen

Auf der Suche nach einem geeigneten neuronalen Zellmodell, um Folgen einer mTOR-Inhibierung durch Temsirolimus auf die Genexpression zu untersuchen, wurden primäre Neuronen aus Mausembryonen isoliert und kultiviert. Hierfür wurden primäre Neuronen aus dem zerebralen Cortex aus Mausembryonen im Stadium E14.5 (*embryonic day 14.5*) präpariert und ausgesät. Abbildung 10 zeigt die Kultivierung der corticalen Neuronen nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

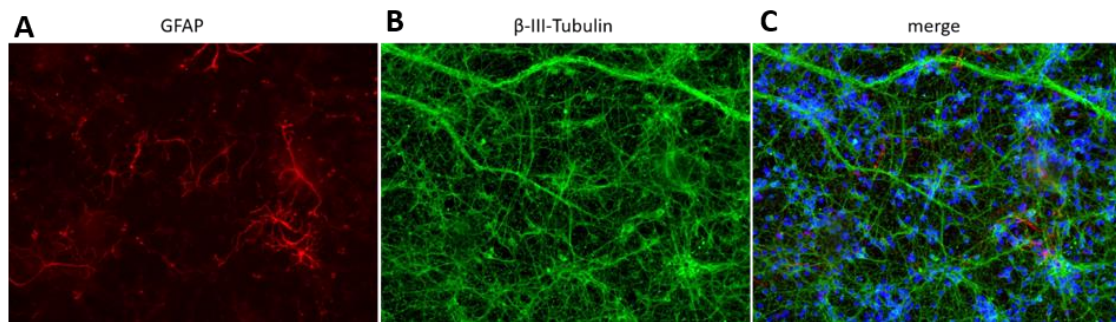


**Abbildung 10: Kultivierung von primären Neuronen der Maus aus dem zerebralen Neocortex.** A) Mikroskopische Aufnahme der primären Neuronen nach Tag 1. B) Mikroskopische Aufnahme der primären Neuronen nach Tag 3. C) Mikroskopische Aufnahme der primären Neuronen nach Tag 5. D) Mikroskopische Aufnahme der primären Neuronen nach Tag 7.

Wie an den Bildern zu erkennen ist, liegen die primären Neuronen an Tag 1 (Abb. 10 A) noch vereinzelt vor, während sie nach Tag 7 (Abb. 10 D) bereits ein dichtes Netzwerk ausgebildet haben. Die Kultivierung war insgesamt erfolgreich, wodurch ein möglicher Einfluss einer Veränderung von mTOR auf die primären Neuronen untersucht werden konnte.

## 3.2 Überprüfung der Differenzierung der primären Neuronen

Um zu überprüfen, ob es sich bei den angezeigten Zellen um primäre Neuronen handelte, wurde eine Färbung mit dem Astrozytenmarker glial fibrillary acidic protein (GFAP) und dem Neuronenmarker  $\beta$ -III-Tubulin angefertigt (Abb. 11).



**Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression von GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin in primären Neuronen der Maus.** A) Immunfärbung mittels GFAP-Antikörper in rot B) Immunfärbung mittels  $\beta$ -III-Tubulin Antikörper in grün C) Überlappende Immunfärbung von GFAP in rot,  $\beta$ -III-Tubulin in grün und Hoechst-Farbstoff zur Anfärbung der Zellkerne in blau.

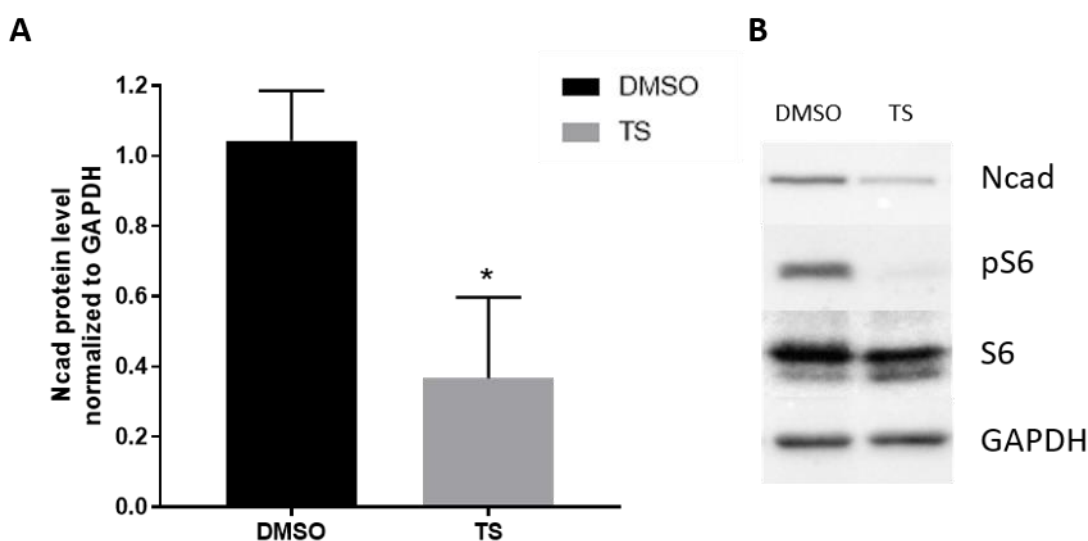
Die Aufnahmen zeigen den Erfolg der Differenzierung der primären Neuronen. Der Großteil der Zellen zeigt eine positive Färbung für den neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin (grün), während die Anzahl der Astrozyten (rot) deutlich geringer ausfällt.

## 3.3 Kandidatenansatz – N-Cadherin

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass die Expression des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin durch mTOR-Aktivität beeinflusst wird (J. Chen et al., 2019; E. Y. Kim et al., 2014; Liang et al., 2014; Mikaelian et al., 2013; Wei et al., 2018). Störungen der N-Cadherin-Expression führen zu Fehlern der Neurogenese und neuronalen Wanderung (Rago et al., 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Keimbahnmutationen in dem das N-Cadherin-Protein kodierenden *CDH2*-Gen eine syndromale neurologische Entwicklungsstörung verursachen (Accogli et al., 2019). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Expression von N-Cadherin durch mTOR reguliert wird und N-Cadherin ein wichtiger Effektor des mTOR-Signalwegs sein könnte. In diesem Teil der Arbeit wurde daher die mTOR-vermittelte Regulation der N-Cadherin-Expression in Neuronen näher untersucht.

### 3.3.1 Expressionsmuster von N-Cadherin

Zunächst wurde die Expression von N-Cadherin nach der Behandlung primärer corticaler Neurone mit dem mTOR-Inhibitor Temozolomid im Vergleich zu DMSO analysiert. Um die Expression auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die primären Neurone für 24 Stunden mit DMSO respektive Temozolomid behandelt, geerntet, die Gesamtproteine isoliert, mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und über die Western Blot-Methode auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Elektrochemilumineszenz wurden die durch Antikörper markierten Proteine N-Cadherin, phosphoryliertes S6, S6 und GAPDH sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ und Excel. Nachfolgende Abbildung (Abb. 12) zeigt den Western Blot und die zugehörige Quantifizierung der primären Neurone nach 24-stündiger Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temozolomid.

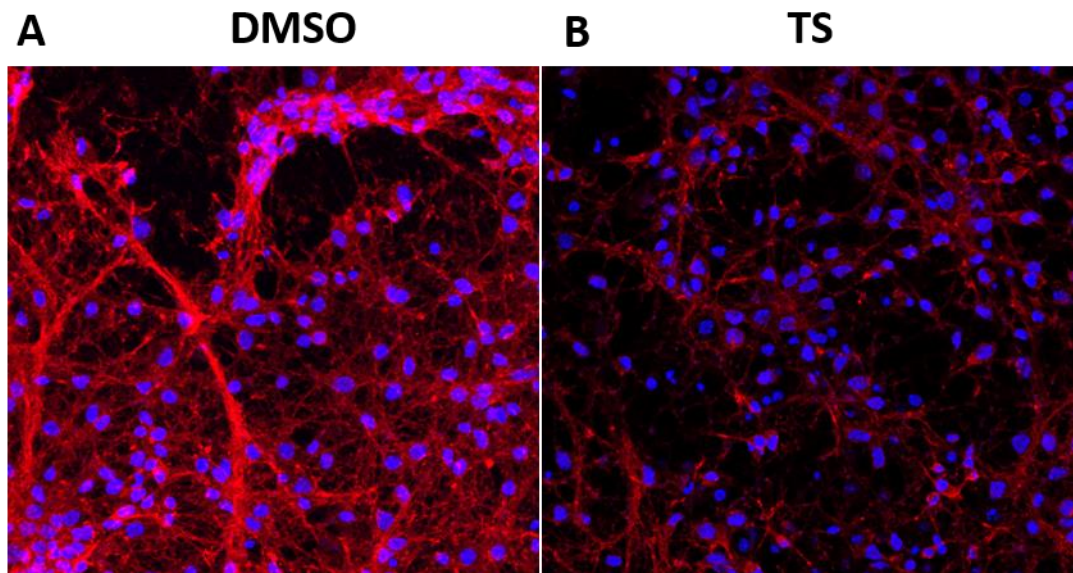


**Abbildung 12: Quantifizierung der Proteinexpression von N-Cadherin, pS6, S6 und GAPDH in primären Neuronen (DIV7).** A) Quantifizierung des Western Blots von B mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot der primären Neurone an Tag 7 mit Banden von N-Cadherin (130 kDa), pS6 (30 kDa), S6 (30 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Abbildungen zeigen zum einen, dass die Inhibition von mTOR erfolgreich war, da die Expression von pS6 deutlich reduziert vorliegt, während die Expression von S6 unverändert bleibt und zum anderen, dass die Inhibition von mTOR eine Reduzierung der Expression von N-Cadherin zur Folge hat.

Zur Bestätigung einer Regulation von mTOR auf Proteinebene wurden auf Deckgläschen ausgesäte primäre Neurone mit DMSO respektive Temozolomid für 24 Stunden

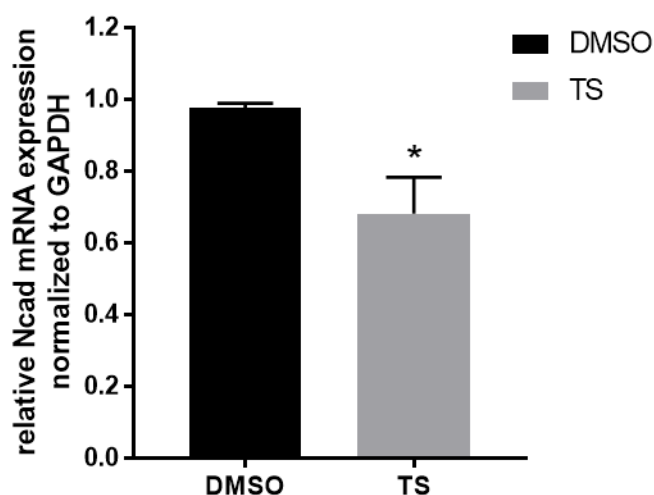
behandelt und die Expression von N-Cadherin mittels Immunfärbung sichtbar gemacht. Abbildung 13 zeigt die Expression von N-Cadherin (rot) nach der Behandlung mit DMSO und Temsirolimus.



**Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Expression von N-Cadherin in primären Neuronen der Maus nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus (TS).** A) Immunfärbung mit N-Cadherin Antikörper und Hoechst-Farbstoff nach Behandlung mit DMSO für 24 Stunden. N-Cadherin positive Zellen sind rot angefärbt, während Zellkerne in blau angefärbt sind. B) Immunfärbung mit N-Cadherin Antikörper und Hoechst-Farbstoff nach Behandlung mit Temsirolimus für 24 Stunden. N-Cadherin positive Zellen sind rot angefärbt, während Zellkerne in blau angefärbt sind.

Die Immunfärbung zeigt eine deutliche Reduktion von N-Cadherin nach der Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zu DMSO. Somit konnte die verminderte Expression von N-Cadherin auf Proteinebene nach der Inhibition von mTOR bestätigt werden.

Um die Expression auf RNA-Ebene zu ermitteln, wurden die Neuronen nach der Behandlung geerntet, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR quantifiziert. Folgende Abbildung (Abb. 14) zeigt die Quantifizierung der RNA-Expression von N-Cadherin nach der Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für 24 Stunden.

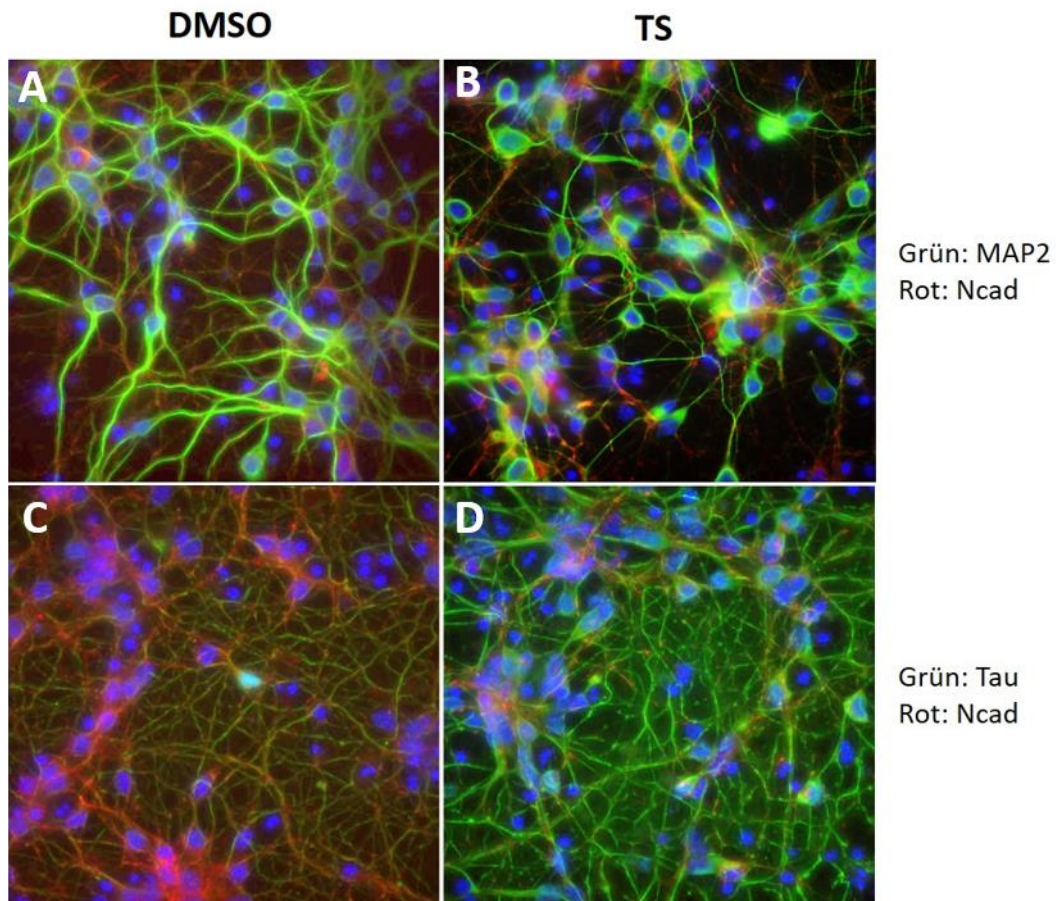


**Abbildung 14: Quantifizierung der mRNA-Expression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temozolomid für 24 Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.** Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Nach der Quantifizierung und Normalisierung von N-Cadherin auf GAPDH, konnte auch auf RNA-Ebene eine Reduktion der Expression von N-Cadherin nach der Inhibition von mTOR beobachtet werden.

### 3.3.2 Vitalität der primären Neuronen nach Temozolomid-Behandlung

Um einen negativen Effekt von Temozolomid auf die Vitalität der Axone beziehungsweise Dendriten auszuschließen, wurden mit Temozolomid behandelte primäre Neuronen auf deren Vitalität überprüft. Hierfür wurde nach der Behandlung und anschließender Fixierung eine Antikörperfärbung mit dem dendritischen Marker MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) und dem axonalen Marker Tau angefertigt. Die folgende Abbildung (Abb. 15) zeigt die beiden Färbungen jeweils in grün, während N-Cadherin in rot co-gefärbt wurde.



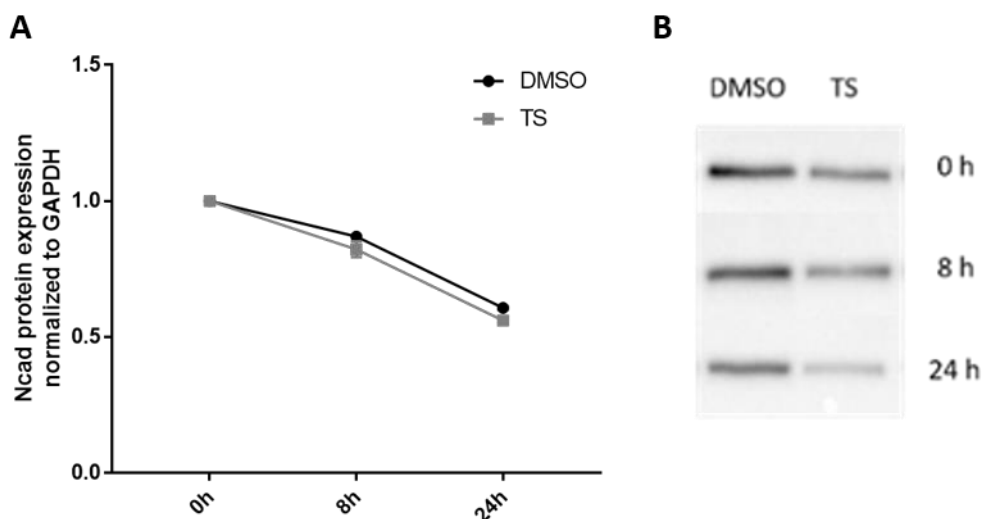
**Abbildung 15: Analyse der primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus (je 24 Stunden) und Anfärbung mit MAP2, Tau und N-Cadherin.**  
 A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Neuronen nach DMSO-Behandlung: grün = MAP2, rot = Ncad, blau = Zellkerne B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Neuronen nach TS-Behandlung: grün = MAP2, rot = Ncad, blau = Zellkerne C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Neuronen nach DMSO-Behandlung: grün = Tau, rot = Ncad, blau = Zellkerne D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären Neuronen nach TS-Behandlung: grün = Tau, rot = Ncad, blau = Zellkerne

Die Abbildungen zeigen, dass keine sichtbare Reduzierung sowohl hinsichtlich der Anzahl der Dendriten als auch der Anzahl der Axone vorliegt. Insgesamt scheint es zu keiner Verminderung der Vitalität der primären Neuronen nach einer Temsirolimus Behandlung zu kommen. Speziell bei der Tau-Färbung kann man zusätzlich beobachten, dass die Färbung von Ncad nach der Inhibition von mTOR deutlich reduziert vorliegt.

### 3.3.3 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von N-Cadherin – Stabilitätsexperimente

Auf der Suche nach dem Mechanismus, durch den die Expression von Ncad durch mTOR reguliert wird, wurden Stabilitäts-Experimente durchgeführt. Um einen Effekt auf die Proteinstabilität zu überprüfen, wurden primäre Neuronen zusätzlich zu DMSO bzw.

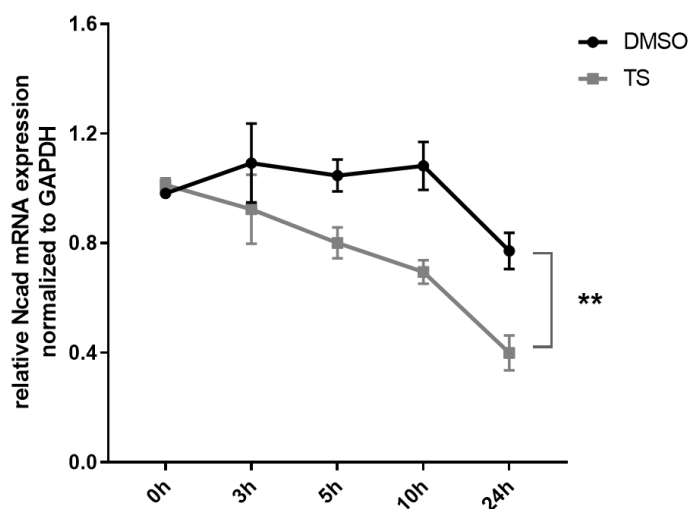
Temsirolimus mit Cycloheximid behandelt, welches die Translation blockiert. Eine unterschiedliche Verlaufskurve der Proteinexpression von Ncad zu verschiedenen Zeitpunkten würde darauf hinweisen, dass mTOR die Proteinstabilität von Ncad beeinflusst. Die folgenden Western Blot-Experimente (Abb. 16) zeigen die Proteinexpression von Ncad nach DMSO respektive Temsirolimus-Behandlung und zusätzlicher Zugabe von Cycloheximid für 0 h, 8 h und 24 h.



**Abbildung 16: Quantifizierung der Proteinexpression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Cycloheximid in primären Neuronen (DIV7).** A) Quantifizierung der Proteinstabilität von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus und Cycloheximid nach den Zeitpunkten 0h, 8h und 24h mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot von N-Cadherin (130 kDa) in primären Neuronen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Quantifizierung der Western Blots zeigt eine ähnliche Verlaufskurve der Expression von Ncad zwischen DMSO und Temsirolimus behandelten Neuronen nach Inhibierung der Proteintranslation mittels Cycloheximid. Ein Einfluss auf die Proteinstabilität von Ncad durch mTOR konnte daher ausgeschlossen werden.

Im nächsten Schritt wurden RNA-Stabilitätsexperimente mit Hilfe von Actinomycin D durchgeführt. Durch die Behandlung von Zellen mit Actinomycin D wird die Transkription inhibiert, wodurch sich ein möglicher Einfluss von mTOR auf die RNA-Stabilität von Ncad untersuchen ließ. Analog zu dem Vorgehen der Untersuchungen bezüglich der Proteinstabilität, wurden die primären Neuronen zusätzlich zu DMSO respektive Temsirolimus mit Actinomycin D behandelt. qPCR Experimente (Abb. 17) zeigen die mRNA-Expression von Ncad nach den unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung (0h, 3h, 5h, 10h und 24h).



**Abbildung 17: Quantifizierung der mRNA-Expression von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO respektive Temozolomid plus Actinomycin D in primären Neuronen (DIV7).** Quantifizierung der mRNA-Stabilität von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temozolomid und Actinomycin D nach den Zeitpunkten 0h, 3h, 5h, 10h und 24h mittels qPCR. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Im Gegensatz zur Proteininstabilität zeigte sich, dass mTOR einen Einfluss auf die RNA-Stabilität von Ncad ausübt. Die RNA-Expression von Ncad sinkt deutlich stärker nach Temozolomid-Behandlung im Vergleich zur Zugabe von DMSO, bei gleichzeitiger Blockierung der Transkription.

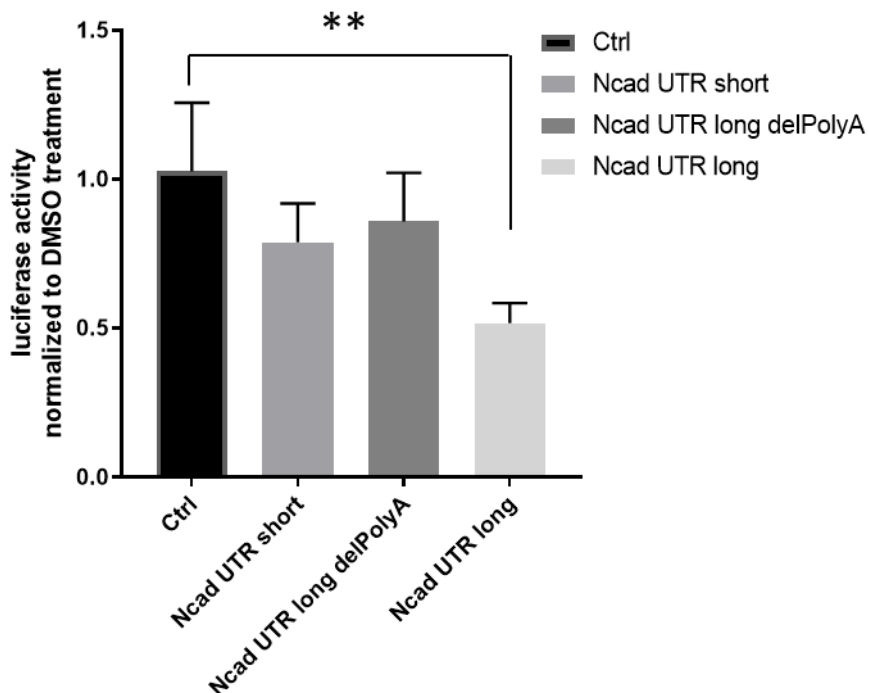
### 3.3.4 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von N-Cadherin – Posttranskriptionelle Regulation

Eine Veränderung der RNA-Stabilität zeigt an, dass die 3' untranslatierte Region (3'UTR) von Ncad involviert sein könnte. Für eine Untersuchung des 3'UTRs von Ncad wurden verschiedene Konstrukte hergestellt (siehe Tabelle 7). N-Cadherin weist drei alternative Polyadenylierungsstellen auf, deren Benutzung 3'UTRs mit einer Länge von ca. 400 bp, 1000 bp und 1150 bp generieren kann. Neben der Kontrolle wurden Plasmide hergestellt, die den kurzen 3'UTR (Ncad UTR short) oder den langen 3'UTR (Ncad UTR long) stromabwärts des Firefly-Luciferase-Gens enthielten. Außerdem wurde ein Plasmid hergestellt, das den langen 3'UTR enthielt und in dem zusätzlich das Polyadenylierungssignal des kurzen 3'UTRs deletiert wurde (Ncad UTR long delPolyA) (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18:** Schematische Abbildung der verwendeten Ncad-Konstrukte: Ncad UTR short, Ncad UTR long delPolyA und Ncad UTR long.

Nach der Transfektion der Plasmide und Behandlung der primären Neuronen mit DMSO beziehungsweise TS wurden Luciferase Assays durchgeführt. Das Ergebnis dieser Assays sieht man in folgender Abbildung (Abb. 19).

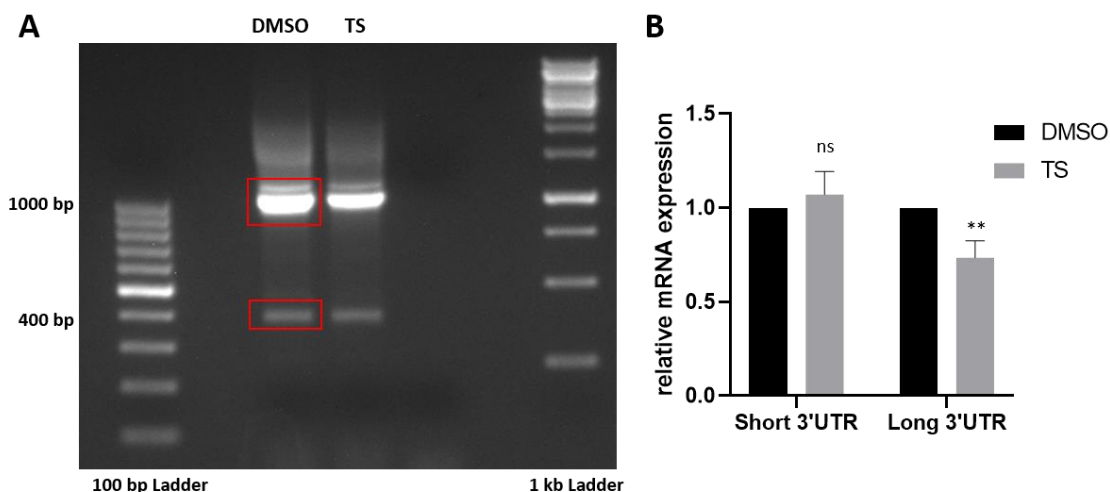


**Abbildung 19:** Analyse der Expression unterschiedlicher 3'UTRs von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO oder Tamsirolimus für 24 Stunden mittels Luciferase Assay. Quantifizierung der Luciferase Assays nach Tamsirolimus-Behandlung (normalisiert zu DMSO) und nach Transfektion des Kontroll-3'UTRs (Ctrl), des 3'UTRs bis zur ersten Polyadenylierungsstelle (Ncad UTR short), des 3'UTRs bis zur zweiten Polyadenylierungsstelle mit einer Deletion des ersten Polyadenylierungssignals (Ncad UTR long delPolyA) und des 3'UTRs bis zur zweiten Polyadenylierungsstelle (Ncad UTR long) mit Hilfe von Excel.

Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Auswertung der Luciferase-Assays zeigt an, dass im Vergleich zur Kontrolle nach der Behandlung mit Temsirolimus lediglich der lange 3'UTR von Ncad mit intaktem Polyadenylierungssignal vermindert exprimiert wird. Diese Beobachtung legt nahe, dass mTOR die Bindung von microRNAs (miRNAs) oder RNA-bindenden Proteinen an den langen 3'UTR und eventuell die alternative Polyadenylierung des Ncad-Transkripts reguliert.

Um diese Theorie zu überprüfen wurden 3'RACE-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden, nach einer Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden, über eine RT-PCR der kurze und der lange 3'UTR von Ncad mit Hilfe eines für Ncad spezifischen und eines an den PolyA-Schwanz bindenden Anker-Primers hergestellt. Auf einem Agarosegel wurden zwei Banden des 3'UTRs von Ncad visualisiert, welche den kurzen (ca. 400 bp) und den langen (ca. 1000 bp) 3'UTR von Ncad darstellen (siehe Abb. 20). Eine Übersicht der polyA-Signale des 3'UTRs von Ncad ist der Abbildung 18 zu entnehmen.



**Abbildung 20: Expression der 3'UTRs von N-Cadherin nach der Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden.** A) Banden des kurzen 3'UTRs (ca. 400 bp) und der beiden langen 3'UTRs (ca. 1000 bp und 1150 bp) dargestellt mit Hilfe eines Agarosegels nach der Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus. B) Quantifizierung der RNA-Expression der unterschiedlichen 3'UTRs von N-Cadherin nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus mittels Agarosegel. Zur statistischen Auswertung wurden vier biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Anhand des Agarosegels kann man feststellen, dass der lange 3'UTR auf der Höhe von ca. 1000 bp nach der Behandlung mit Temsirolimus reduziert vorliegt, während der kurze 3'UTR keine sichtbare Veränderung zeigt. Auf der Höhe von ca. 1000 bp befinden sich

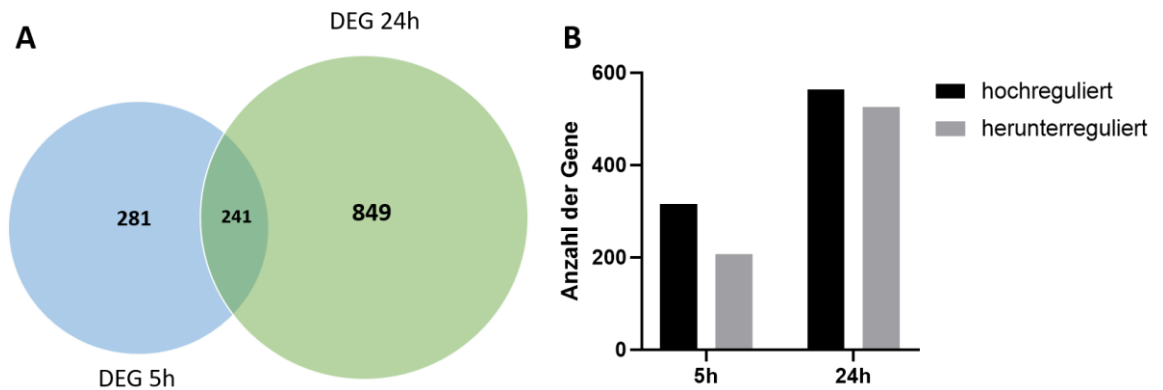
mehrere Banden. Das liegt daran, dass in diesem Bereich mehrere polyA-Stellen zu finden sind, welche mit geringen Größenänderungen einhergehen. Eine Quantifizierung der einzelnen Banden des langen 3'UTRs war aufgrund der Nähe der Banden zueinander in der Höhe von ca. 1000 bp leider nicht möglich. Eine Quantifizierung der beiden Banden im Bereich 1000 – 1150 bp ergab eine signifikant reduzierte Expression des langen 3'UTRs nach der Inhibition von mTOR, während der kurze 3'UTR keine signifikante Änderung der Expression anzeigt. Zusammen mit dem Ergebnis der Luciferase-Assays zeigt sich eine Funktion von mTOR bei der Regulierung des 3'UTRs von Ncad. Aufgrund einer fehlenden Kontrolle kann eine reduzierte RNA-Menge nach der Behandlung mit Temsirolimus zu der verminderten Expression des langen 3'UTRs als Grund nicht ausgeschlossen werden. Zudem kommt es zu keiner vollständigen Reduktion des langen 3'UTRs, weswegen andere Regulationsmechanismen wie die Bindung von RNA-bindenden Proteine eine Rolle spielen könnte.

### **3.4 Identifizierung von mTOR-regulierten Genen in Neuronen (Hypothese-freier Ansatz)**

Um weitere neue Zielgene von mTOR zu identifizieren wurde neben dem Kandidatenansatz für N-Cadherin auch ein Hypothese-freier Ansatz verfolgt.

#### **3.4.1 RNA Sequenzierung (RNA-seq)**

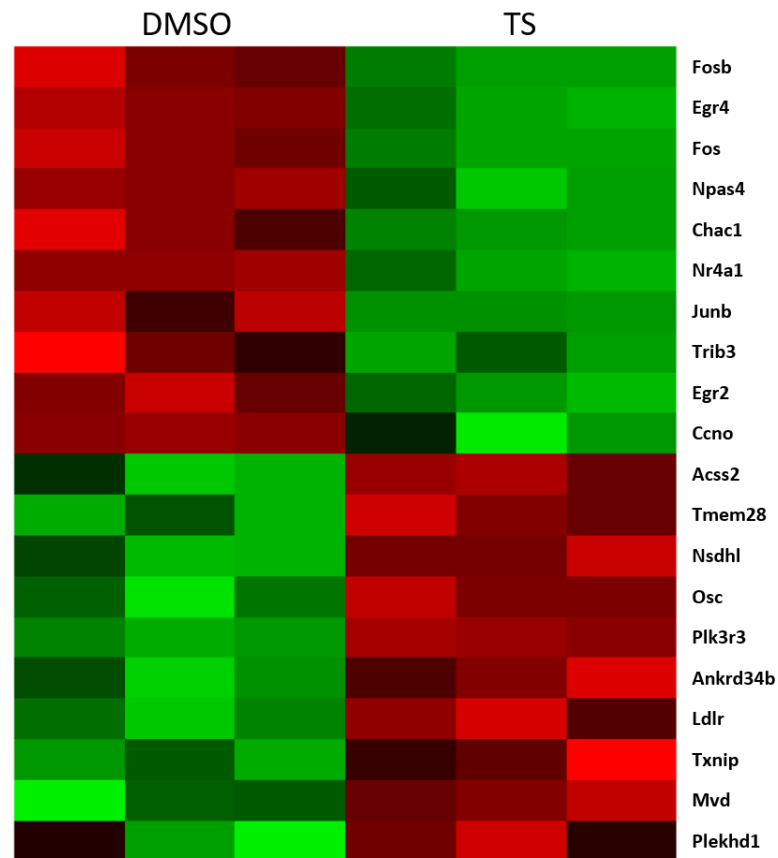
Für diesen Ansatz wurde eine 3' RNA-Sequenzierung mit Hilfe des QuantSeq 3' mRNA-Seq Kits von Lexogen durchgeführt. Um mTOR zu inhibieren wurden primäre corticale Neuronen mit Temsirolimus behandelt und nach 5 Stunden und 24 Stunden geerntet. Als Kontrolle wurden Neuronen zeitgleich mit DMSO behandelt. Nach der Isolation der RNA und der Anfertigung der Library wurden mit Hilfe der RNA-Sequenzierung Änderungen in der Expression des Transkriptoms ermittelt. Ein Venn-Diagramm der Gene, die nach 5 Stunden und 24 Stunden zwischen DMSO und Temsirolimus-Behandlung differentiell exprimiert sind, werden in folgender Abbildung gezeigt (Abb. 21).



**Abbildung 21: Auswertung der RNA-Sequenzierung.** A) Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEG) nach einer Behandlung mit Temozolomid für 5 bzw. 24 Stunden im Vergleich zu DMSO. B) Anzahl der Gene, die nach mTOR-Inhibition hochreguliert bzw. herunterreguliert vorliegen. Die Daten beruhen auf Transkriptom-Analysen mittels RNA-Sequenzierung von primären Neuronen. Folgende Kriterien wurden für DEGs festgelegt: CPM>10; log<sub>2</sub>FC>0,5; padj<0,05

Anhand des Venn-Diagramms ist zu erkennen, dass bereits nach 5 Stunden 522 Gene auf RNA-Niveau differentiell exprimiert vorliegen. Nach 24 Stunden sind es 1090 Gene. Weiterhin gibt es nach 5 und 24 Stunden eine Überschneidung von 241 differentiell exprimierten Genen (DEGs). Zudem wurde festgestellt, dass die Anzahl der Gene, die hoch- und die herunterreguliert vorliegen, eine ähnliche Anzahl aufweisen. So sind 315 bzw. 564 Gene nach 5 bzw. 24 Stunden hochreguliert, während 207 und 526 Gene zu den jeweiligen Zeitpunkten herunterreguliert sind.

Mit Hilfe einer Heat-Map (siehe Abb. 22) werden die 10 Gene gezeigt, die nach 5 Stunden am stärksten hoch- bzw. herunterreguliert vorliegen.



**Abbildung 22: Heat-Map der fehlregulierten Gene.** Gezeigt werden die 10 Gene, die nach einer fünfständigen Temozolomid-Behandlung im Vergleich zu DMSO am stärksten hochreguliert vorliegen (obere Hälfte) sowie diejenigen Gene, die nach einer derartigen Behandlung am stärksten reduziert vorliegen (untere Hälfte).

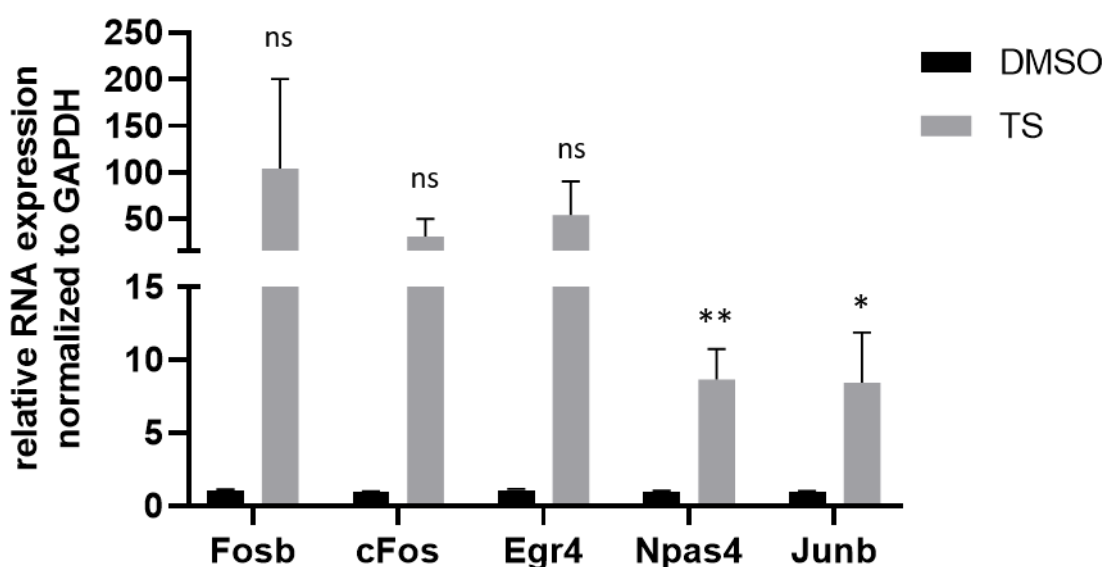
Anhand der Heat-Map sind in der oberen Hälfte diejenigen Gene angezeigt, die nach einer Behandlung mit Temozolomid den höchsten Anstieg ihrer Expression auf RNA-Ebene erfahren. Diese Gene werden auf der rechten Seite als grün angezeigt. In der unteren Hälfte und somit rechts in rot dargestellt, werden die Gene, welche nach der Inhibition von mTOR am stärksten reduziert vorliegen.

Mit Hilfe einer Gene Ontology-Analyse wurde festgestellt, dass die hochregulierten Gene vor allem in Entwicklungsprozessen und in der Regulation der Transkription involviert sind. Auffällig war, dass es sich hierbei um viele sogenannte unmittelbar-frühe Gene („immediate early genes“; IEGs) handelt. Im Gegensatz dazu wurde bei dieser Analyse für die herunterregulierten Gene eine Anreicherung für metabolische Prozesse wie Sterol und Lipid Biosynthese und Metabolismus gefunden. Es waren vor allem Gene betroffen, die an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind.

### 3.4.2 mTOR reguliert die Expression der unmittelbar-frühen Gene in Neuronen

#### 3.4.2.1 Validierung der Hochregulation unmittelbar früher Gene

Um die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zu verifizieren, wurden zunächst qPCR Experimente durchgeführt. Hierbei wurden sowohl RNA-Proben verwendet, die für die RNA-Sequenzierung bereits genutzt wurden, als auch neue mit Temozolomid behandelte RNA-Proben von primären Neuronen. Das Ergebnis aus einer Auswahl von Genen (Fosb, cFos, Egr4, Npas4 und Junb) wird in Abbildung 23 dargestellt.

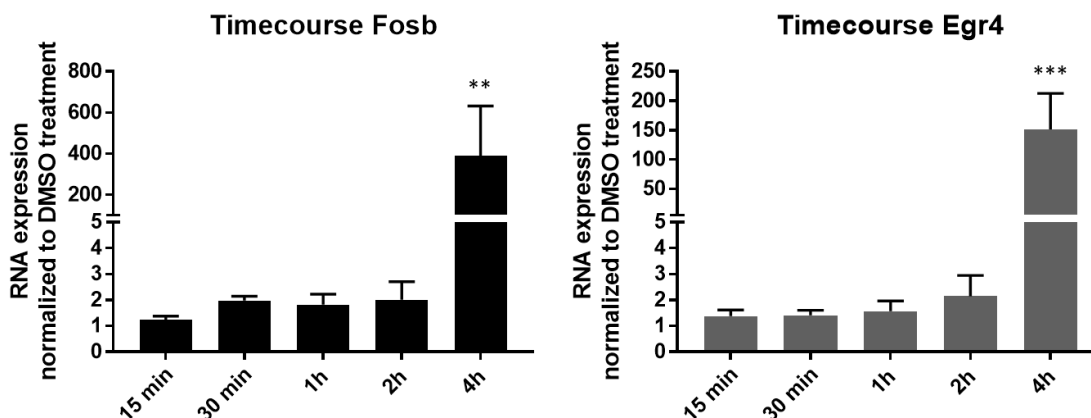


**Abbildung 23: Quantifizierung der mRNA-Expression von Fosb, cFos, Egr4, Npas4 und Junb nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temozolomid für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.** Für die Verifizierung wurden zwei biologische Replikate verwendet, die bereits für die RNA-Sequenzierung benutzt wurden und zwei neue mit Temozolomid behandelte biologische Replikate. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Quantifizierung der qPCR zeigt, dass alle untersuchten Gene nach der Inhibition von mTOR für 5 Stunden, einen Anstieg in ihrer Expression auf RNA-Ebene zeigen. Vor allem Fosb, cFos und Egr4, welche alle um mindestens das 50-fache erhöht vorliegen. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung konnten für die hochregulierten Gene auf RNA-Ebene bestätigt werden.

### 3.4.2.2 Unmittelbar-frühe Gene werden 4 Stunden nach TS-Behandlung hochreguliert

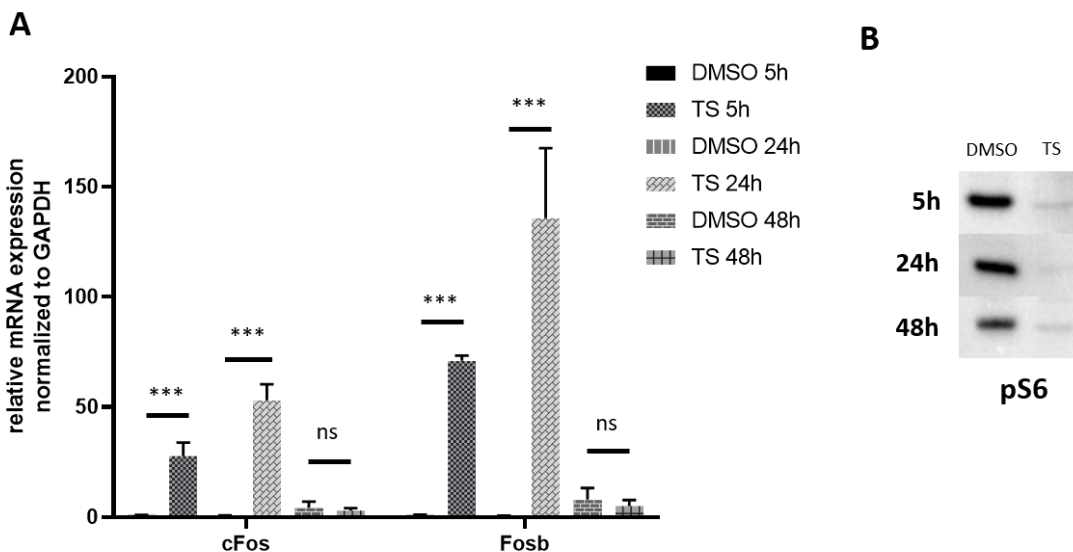
IEGs werden für gewöhnlich nach einer Stimulation oder einem Impuls innerhalb weniger Minuten transkribiert. Zudem ist die Transkription dieser Gene nur vorübergehend, sodass ihre Expression nach kurzer Zeit wieder auf Normalniveau sinkt. Um zu überprüfen, ob die mTOR-Inhibition einen ähnlich raschen Anstieg der IEG-Expression bewirkt, wurde ein Zeitverlauf erstellt. Die folgende Abbildung 24 zeigt einen Zeitverlauf für die beiden Gene Fosb und Egr4, deren Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden) nach einer Behandlung mit Temsirolimus auf RNA-Ebene untersucht wurde.



**Abbildung 24: Zeitverlauf-Analyse der RNA-Expression der beiden Gene Fosb und Egr4 nach mTOR-Inhibition mittels qPCR.** A) Zeitverlauf der RNA-Expression von Fosb nach Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zu DMSO nach 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden. B) Zeitverlauf der RNA-Expression von Egr4 nach Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zu DMSO nach 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Quantifizierung der qPCR für die beiden Gene Fosb und Egr4 zeigen ein ähnliches Muster. Zwei Stunden nach einer Behandlung mit Temsirolimus gibt es keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Expression von Fosb und Egr4. Nach vier Stunden jedoch kommt es zu einem massiven Anstieg beider Gene. Die Expression von Fosb steigt hierbei um das 400-fache, die von Egr4 um etwa das 150-fache.

Um die Dauer der Erhöhung der Expression von IEGs zu untersuchen wurden spätere Zeitpunkte nach einer mTOR Inhibition überprüft. Für diesen Versuch wurden qPCR Experimente nach einer Behandlung von 5 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden durchgeführt. Abbildung 25 zeigt diesen Zeitverlauf für die beiden Gene Fosb und cFos.

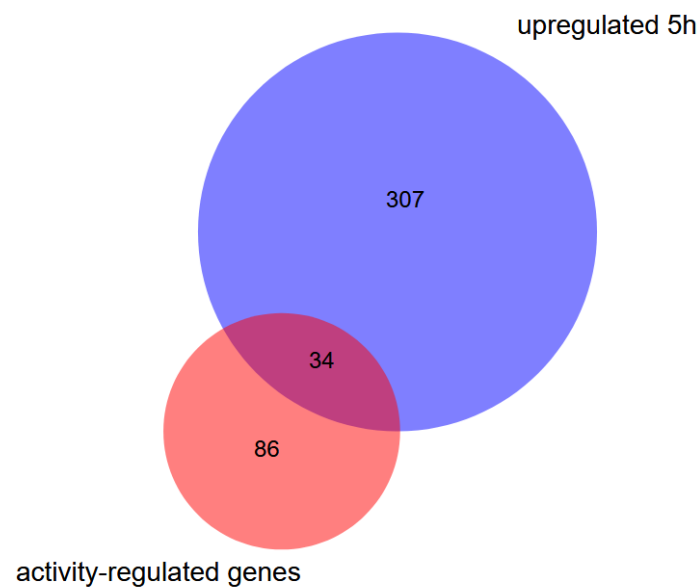


**Abbildung 25: Zeitverlauf-Analyse der RNA-Expression der beiden Gene cFos und Fosb nach mTOR-Inhibition mittels qPCR.** A) Zeitverlauf der RNA-Expression von cFos nach Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zu DMSO nach 5 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden. B) Western Blot von pS6 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (5h, 24h und 48h) nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Auch hier ergibt sich ein eher untypisches Muster für IEGs. Die erhöhte Expression von cFos und Fosb nach Temsirolimus hält für mindestens 20 Stunden an. Zwischen 24 Stunden und 48 Stunden nach einer Inhibition von mTOR kommt es zu einem Absinken ähnlich des Normalniveaus. Western Blot-Analysen von pS6 zeigen eine stabile Inhibition des mTOR-Signalswegs über 48 Stunden. Zusammenfassend kommt es also sowohl zu einem verspäteten Anstieg der IEGs, als auch zu einer länger anhaltenden Aufrechterhaltung der erhöhten Expression.

### 3.4.2.3 Zusammenhang mit Genen, die nach neuronaler Aktivität angeregt werden

Nach einem Vergleich unserer Daten mit bereits veröffentlichten Ergebnissen wurde festgestellt, dass unter den nach mTOR-Inhibition hochregulierten Genen viele waren, die durch neuronale Aktivität angeregt werden. Dies wurde in der Studie von Flavell et al., 2008 gezeigt, die Aktivität-regulierende Gene in der Synapse analysierten, welche unter der Kontrolle des synaptischen Transkriptionsfaktors *myocyte enhancer factor-2* (MEF2) stehen. Ein Vergleich der beiden Datensätze wird in folgender Abbildung 26 gezeigt.

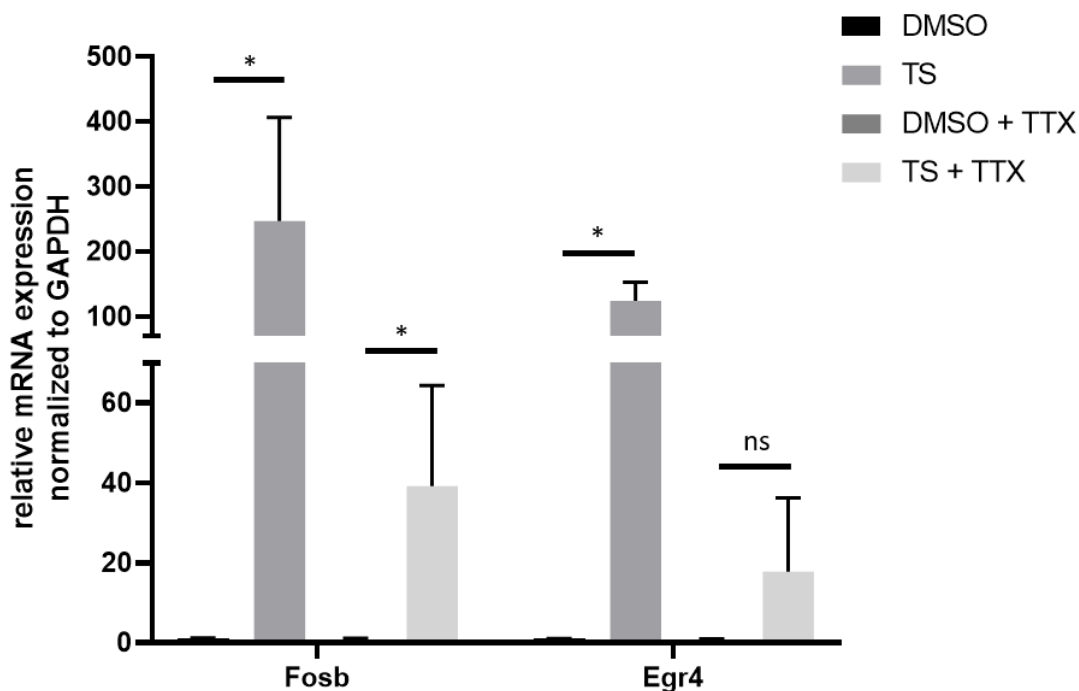


**Abbildung 26: Venn-Diagramm über die Gene, die nach einer fünfständigen Behandlung mit Temozolomid hochreguliert vorliegen und Gene, welche nach neuronaler Aktivität induziert werden** (Flavell et al., 2008).

Nach dem Vergleich der beiden Datensätze konnte eine bemerkenswerte Überlappung der publizierten aktivitätsregulierten Gene und der in diesem Projekt gefundenen, nach 5 Stunden Temozolomid-Behandlung hochregulierten, Gene beobachtet werden. Unter diesen Genen wurden wichtige Transkriptionsfaktoren wie cFos, Egr1 und Klf4 als auch synaptische Proteine wie Arc, Bdnf und Homer1 identifiziert. Die Inhibition von mTOR zieht demnach ein Expressionsmuster nach sich, dass dem nach einer neuronalen Aktivierung ähnelt.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Behandlung der Neuronen mit Temozolomid eine gesteigerte neuronale Aktivität verursacht, die dann wiederum die Expression der IEGs induziert. Alternativ könnte die Expression der IEGs aber auch unabhängig einer Steigerung der neuronalen Aktivität induziert werden. Um dies näher zu untersuchen wurden die primären Neuronen zusätzlich zu der Inhibition von mTOR mit Tetrodotoxin (TTX) behandelt. Dabei handelt es sich um ein Nervengift, das spannungsaktivierte Natriumkanäle blockiert, wodurch keine Aktionspotenziale mehr ausgelöst werden können und in der Folge die Nervenerregung unterbunden wird. Falls die Expressionssteigerung der IEGs nach Temozolomid-Behandlung abhängig von neuronaler Aktivität ist, sollte dieser Effekt nach TTX-Behandlung nicht mehr zu beobachten sein. Die folgende Abbildung 27 zeigt die RNA-Expression der beiden IEGs

Fosb und Egr4 nach einer Behandlung mit DMSO, Temsirolimus, und einer jeweils zusätzlichen Behandlung mit Tetrodotoxin.



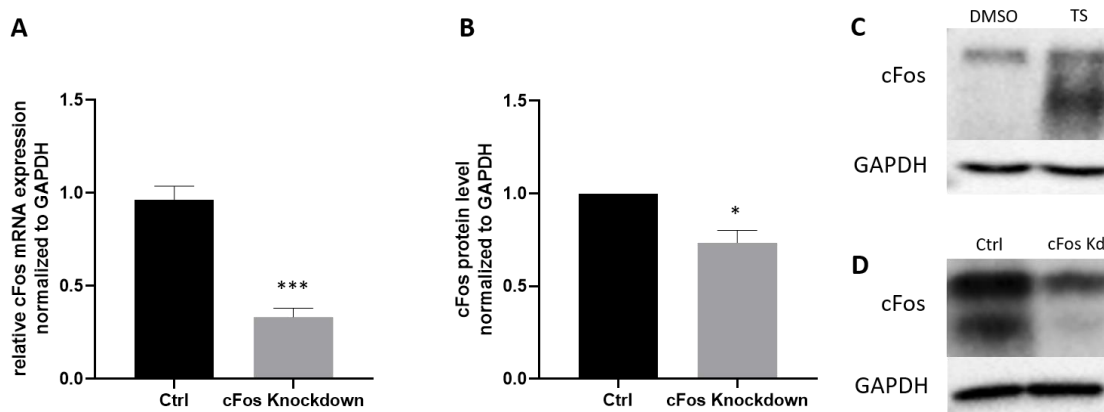
**Abbildung 27: Quantifizierung der mRNA-Expression von Fosb und Egr4 nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus plus Tetrodotoxin (TTX) in primären Neuronen (DIV7).** Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Sowohl mit als auch ohne TTX stieg die Expression der IEGs nach Behandlung mit Temsirolimus stark an. Nach TTX-Behandlung war dieser Anstieg jedoch deutlich geringer. Die Expression von Fosb wurde ohne TTX um das 247-fache gesteigert, mit TTX jedoch nur um das 39-fache. Bei Egr4 stieg die Expression ohne TTX nach mTOR-Inhibition um das 123-fache, mit TTX nur um das 17-fache (p-Wert 0,12). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine neuronale Aktivierung zwar nicht essentiell für den Expressionsanstieg der IEGs nach Temsirolimus-Behandlung ist, diesen aber verstärken kann.

#### 3.4.2.4 mTOR-Inhibierung induziert die Expression der IEGs auf Proteinebene

Als Nächstes galt es die Überexpression der IEGs auf Proteinebene zu überprüfen. Um die Spezifität des cFos-Antikörpers zu überprüfen, wurde ein cFos Knockdown in primären Neuronen etabliert. Ein Grund hierfür war unter anderem, dass nach Verwendung des cFos-Antikörpers zwei Banden unterschiedlicher Größe im Westernblot beobachtet wurden (Abb 28 C). Mithilfe des cFos-Knockdowns sollte überprüft werden,

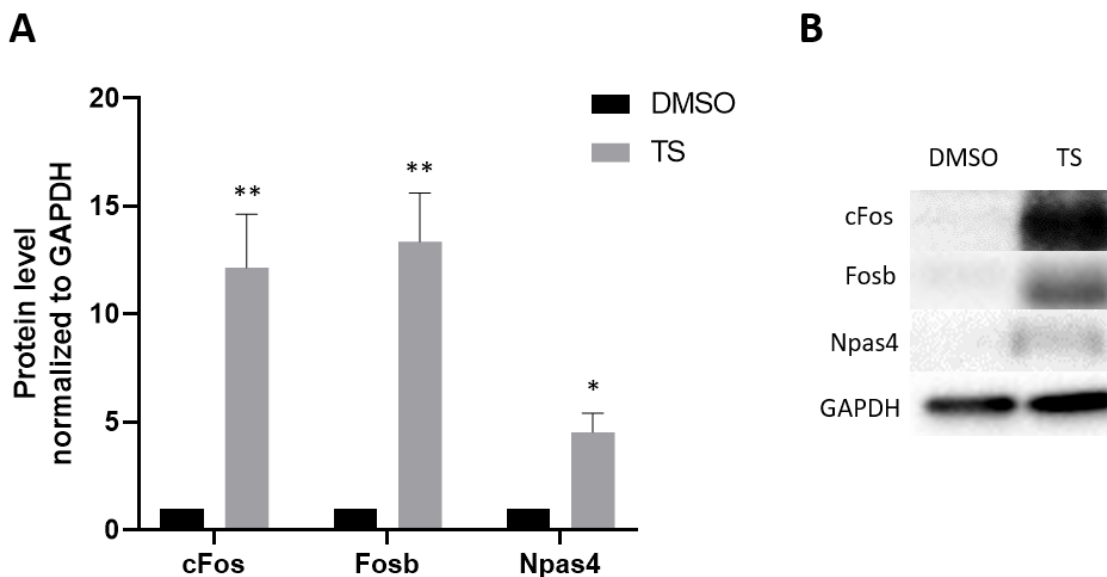
welche dieser Banden spezifisch ist. Zusätzlich wurde die Expression von cFos nach dessen Knockdown auf RNA-Ebene analysiert. Für die Versuche wurden die primären Neurone mit einer Accell Control siRNA und mit einer Accell siRNA gegen cFos für 48 Stunden behandelt, RNA respektive Proteine isoliert und mittels qPCR und Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Western Blots und qPCRs sind in folgender Abbildung aufgezeigt (Abb. 28).



**Abbildung 28: Analyse der Expression von cFos nach einem Knockdown von cFos in primären Neuronen mittels Western Blot und qPCR.** A) Expression von cFos auf mRNA-Ebene nach Transfektion einer Kontroll-siRNA (Ctrl) und einer Accell siRNA (cFos Knockdown). B) Expression von cFos auf Proteinebene nach Transfektion einer Kontroll-siRNA (Ctrl) und einer Accell siRNA (cFos Knockdown). C) Western Blot von GAPDH (36 kDa) und den beiden cFos-Banden (ca. 60 kDa) nach Behandlung mit DMSO bzw. Temsirolimus für 24 Stunden. D) Western Blot von GAPDH (36 kDa) und den beiden cFos-Banden (ca. 60 kDa) nach der Zugabe der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen cFos. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von ImageJ, ImageLab und Excel. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die qPCR Ergebnisse (Abb. 28 A) zeigen, dass der Knockdown in den primären Neuronen erfolgreich war. Die Expression von cFos zeigt einen deutlichen Rückgang auf RNA-Ebene (60 %) nach der Zugabe der siRNA gegen cFos. Auf Proteinebene zeigt sich ebenfalls ein Rückgang von cFos von in dem Fall ca. 30 % (siehe Abb. 28 B). Zusätzlich war eine der beiden Banden von dem Knockdown deutlich stärker betroffen, was darauf hindeutet, dass es sich bei der Zweitbande um eine Kreuzreaktion handelt.

Für die Überprüfung der Expression der IEGs auf Proteinebene wurden primäre Neuronen für 24 Stunden mit Temsirolimus behandelt, Proteinlysate hergestellt und die Proteinexpressionsmuster der IEGs cFos, Fosb und Npas4 mittels SDS-Page und Western Blot visualisiert. Eine Übersicht der Western Blots und deren Quantifizierung ist in der folgenden Abbildung 29 dargestellt.

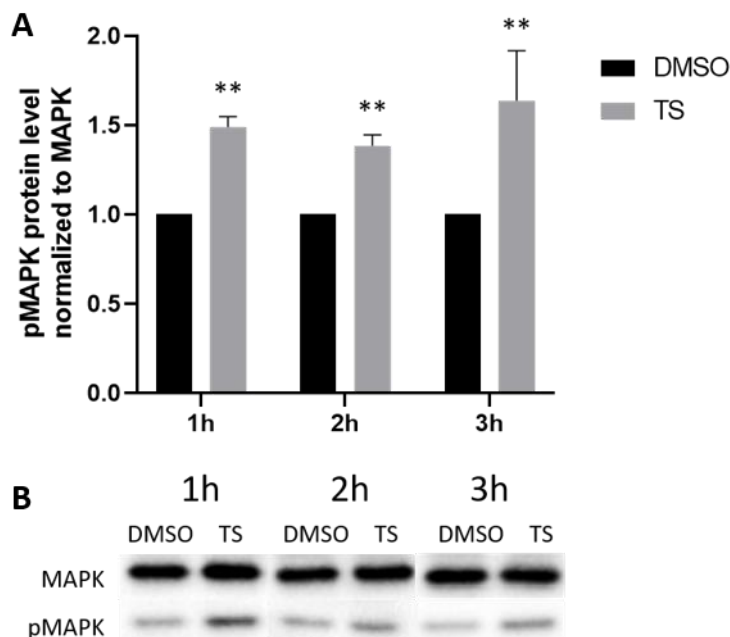


**Abbildung 29: Analyse der Proteinexpression von cFos, Fosb, Npas4 und GAPDH in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temozolomid für 24 Stunden.** A) Quantifizierung des Western Blots von B mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot der primären Neuronen an Tag 7 mit Banden von cFos (ca. 60 kDa), Fosb (48 kDa), Npas4 (120 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Wie anhand der Blots und der zugehörigen Quantifizierung zu sehen ist, werden die IEGs cFos, Fosb und Npas4 nach einer Inhibition von mTOR auf Proteinebene vermehrt exprimiert. Speziell cFos und Fosb erfahren hierbei eine mehr als 10fache Erhöhung nach der Behandlung mit Temozolomid. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung und qPCR konnte demnach mit Hilfe der Western Blot-Methode auf Proteinebene bestätigt werden.

#### 3.4.2.5 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation der IEGs

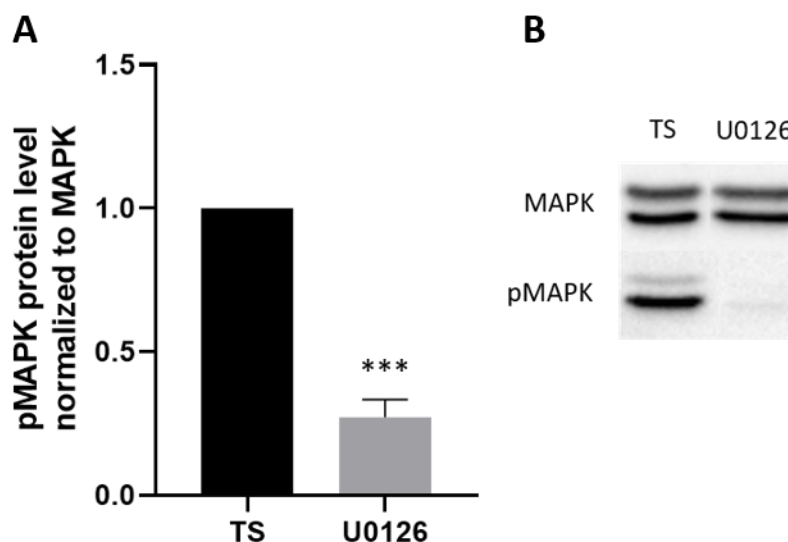
Nach der Bestätigung der erhöhten Expression auf Proteinebene, galt der nächste Schritt der Analyse des Mechanismus der erhöhten IEG-Expression nach mTOR-Inhibition. Es ist bekannt, dass der MAP-Kinase-Signalweg die Expression verschiedener IEGs wie beispielsweise cFos reguliert. Weiterhin zeigten Studien, dass eine Inhibition von mTOR mit einer erhöhten Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs einhergeht. Es könnte daher sein, dass die Steigerung der IEG-Expression nach mTOR-Inhibition auf eine erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs zurückzuführen ist. Um diese These zu bestätigen wurde die Aktivität dieses Signalwegs überprüft. DMSO und Temozolomid behandelte Neuronen wurden mit den Antikörpern MAPK und phospho-MAPK (pMAPK) inkubiert und mittels Western Blot visualisiert. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung 30 zu sehen.



**Abbildung 30: Analyse der Proteinexpression von pMAPK und MAPK in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temozolomid.** A) Quantifizierung des Western Blots von B mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot der primären Neuronen 1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden nach DMSO- beziehungsweise Temozolomid-Behandlung mit Banden von MAPK und pMAPK (jeweils 42 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Experimente zeigen, dass nach den unterschiedlichen Zeitpunkten der Temozolomid-Behandlung (1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden) eine erhöhte Phosphorylierung von MAPK, also eine erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs vorliegt. Eine erhöhte Aktivität könnte den Hinweis liefern, dass es sich hierbei um den zugrundeliegenden Mechanismus handelt, weswegen die IEGs verzögert nach der Inhibition von mTOR vermehrt exprimiert werden. Die bereits nach einer Stunde auftretende erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs spricht aber dafür, dass dies nicht der alleinige Mechanismus zu sein scheint.

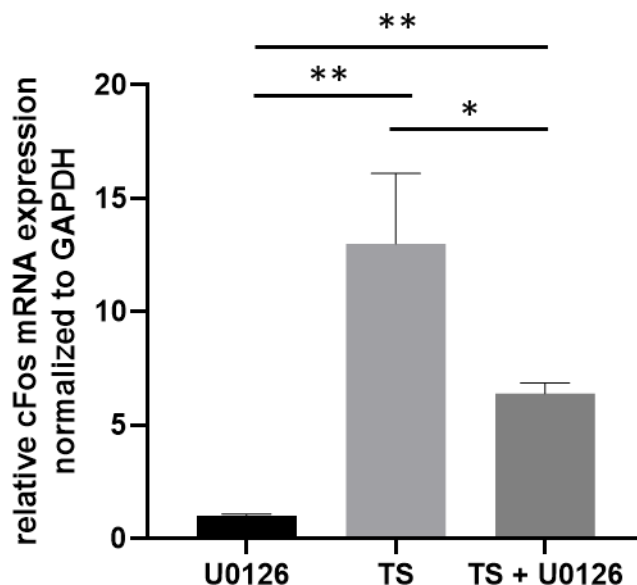
Um einen Einfluss des MAP-Kinase-Signalwegs auf die Steigerung der Expression der IEGS nach Temozolomid-Behandlung weiter zu untersuchen, wurde dieser Signalweg in einem nächsten Experiment inhibiert. Hierfür wurden primäre Neuronen zusätzlich zu der Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temozolomid mit dem MAP-Kinase-Inhibitor U0126 behandelt. Zunächst wurde überprüft, ob U0126 den MAP-Kinase-Signalweg inhibiert. Primäre Neuronen wurden für 3 Stunden mit Temozolomid oder U0126 behandelt und anschließend auf die Proteinexpression von MAPK und pMAPK mittels Western Blot überprüft. Eine Auswertung dieser Experimente ist in folgender Abbildung 31 zu sehen.



**Abbildung 31: Analyse der Proteinexpression von pMAPK und MAPK in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit Temsirolimus respektive U0126 für drei Stunden.** A) Quantifizierung des Western Blots von B mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot der primären Neuronen drei Stunden nach Temsirolimus beziehungsweise U0126-Behandlung mit Banden von MAPK und pMAPK (jeweils 42 und 44 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Experimente zeigen, dass eine Behandlung mit U0126 zu einer erfolgreichen Reduktion der Phosphorylierung von MAPK und somit zu einer Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges führt. Die Expression von pMAPK wurde nach der Gabe von U0126 um etwa 70 % im Vergleich zu Temsirolimus reduziert.

Als nächsten Schritt wurde der Einfluss einer Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges auf die Expression des IEGs cFos überprüft. Hierzu wurden die Neuronen mit DMSO, Temsirolimus und Temsirolimus plus U0126 für 5 Stunden behandelt. Nach Isolation der RNA wurde die Expression von cFos mittels qPCR ermittelt. Die Quantifizierung dieser Experimente sind in Abbildung 32 abgebildet.



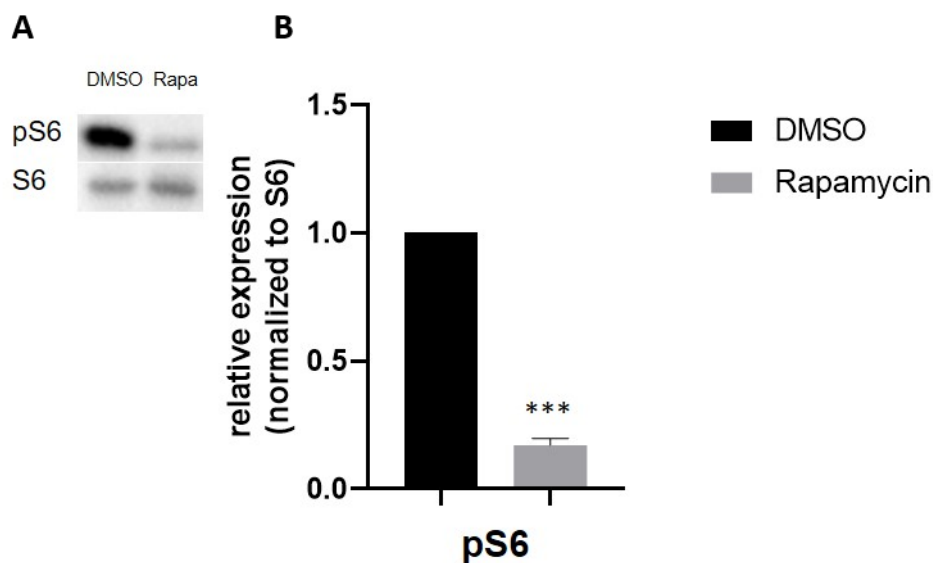
**Abbildung 32: Analyse der mRNA-Expression von cFos primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit U0126, Tamsirolimus oder Tamsirolimus und U0126 für fünf Stunden mittels qPCR.** Quantifizierung der qPCR mit Hilfe von Microsoft Excel. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Auswertung zeigt, dass der MAP-Kinase-Signalweg an der Expressionsregulation von cFos beziehungsweise an der erhöhten Expression von cFos nach Inhibition von mTOR beteiligt ist. Eine gleichzeitige Inhibition von mTOR und des MAP-Kinase-Signalwegs resultiert in einer deutlich geringeren Expressionserhöhung von cFos gegenüber einer alleinigen Inhibition von mTOR im Vergleich zu DMSO. Dennoch ist eine erhöhte Expression nach der doppelten Inhibition zu sehen, was darauf hindeutet, dass der MAP-Kinase-Signalweg nicht alleinig für die erhöhte Expression von cFos nach Tamsirolimus-Behandlung verantwortlich ist.

#### 3.4.2.6 Evaluierung der Expression der IEGs *in vivo*

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass mTOR die Expression verschiedener IEGs in primären Neuronen reguliert, sollte darüber hinaus überprüft werden, ob diese Regulation auch *in vivo* stattfindet. Dafür wurden zunächst tragende Mäuse im Stadium E16.5 intraperitoneal mit Rapamycin injiziert. Um einen inhibitorischen Effekt von Rapamycin auf mTOR zu untersuchen wurden zunächst die Expressionsmuster von S6 und pS6 auf Proteinebene überprüft. Hierfür wurden die Mäuse 24 Stunden nach Rapamycin-Injektion getötet, der zerebrale Cortex der Embryos präpariert und für die Gewinnung von Proteinlysate verwendet. Anschließend wurde ein Westernblot

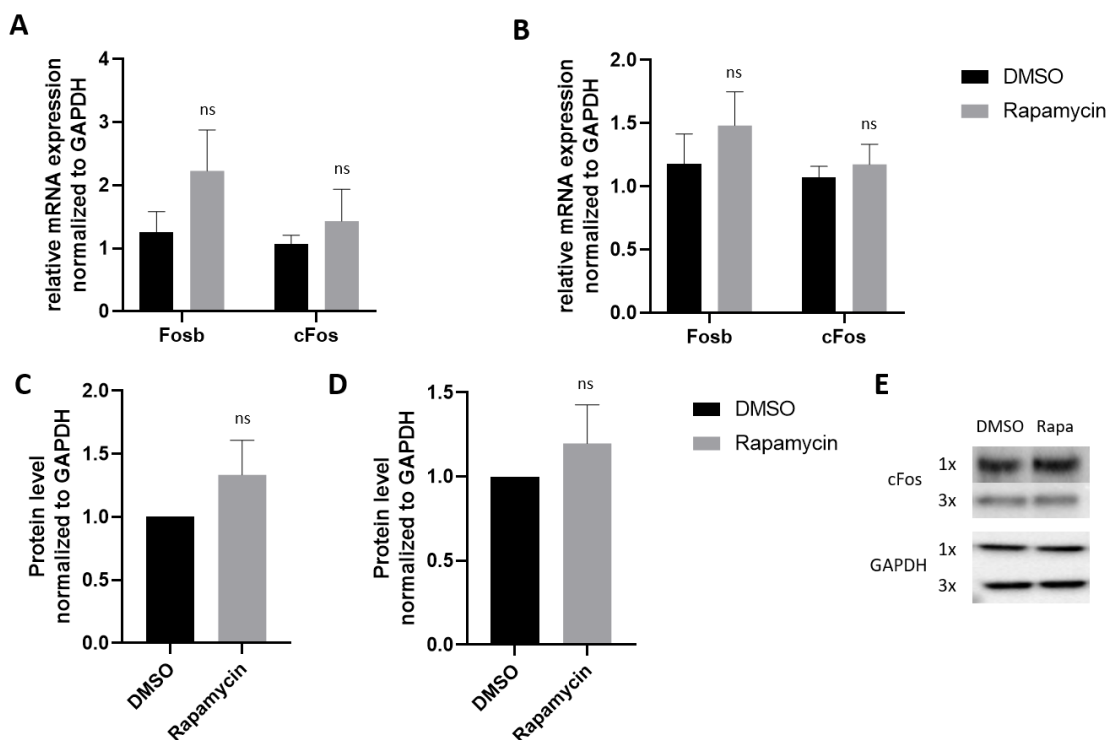
durchgeführt. Die folgende Abbildung 33 zeigt den inhibitorischen Effekt von Rapamycin *in vivo*.



**Abbildung 33: Quantifizierung der Proteinexpression von pS6 und S6 von Cortex-Proben der Embryonen 24 Stunden nach intraperitonealer Rapamycin-Injektion des Muttertiers (1 mg pro kg Körpergewicht).** A) Western Blot der Cortex-Samples mit Banden von pS6 und S6 (je 36 kDa) B) Quantifizierung des Western Blots von A mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Analyse von pS6 zeigt, dass bereits 24 Stunden nach einer intraperitonealen Injektion von Rapamycin ein inhibitorischer Effekt auf mTOR vorliegt. Die Expression von pS6 liegt nach der Behandlung mit Rapamycin nur noch bei 20 % im Vergleich zu einer DMSO-Injektion.

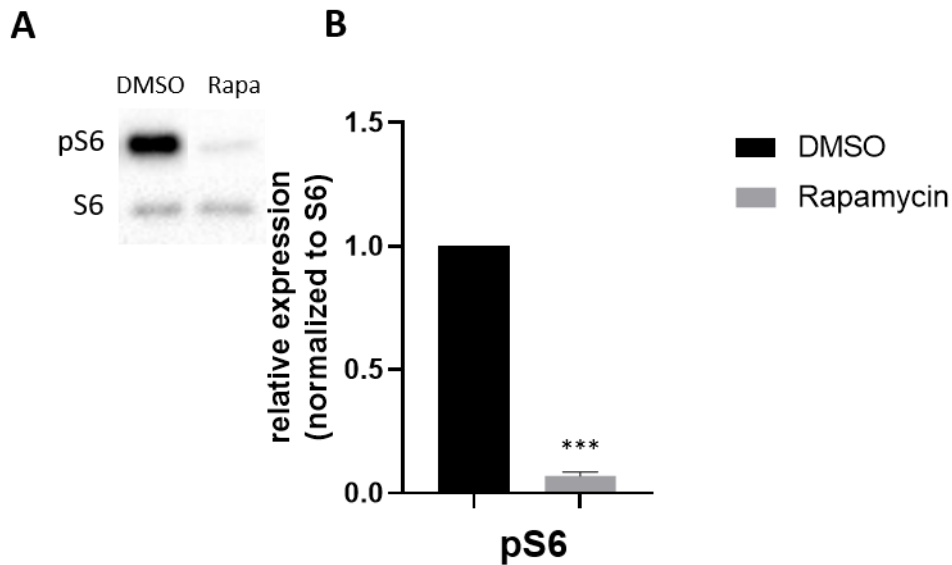
Im Anschluss wurde die Expression von cFos sowie Fosb stellvertretend für die IEGs, welche in den Temsirolimus behandelten Neuronen hochreguliert vorlagen, auf RNA- und Proteinebene nach einmaliger Injektion (E16) oder nach drei Injektionen an drei aufeinander folgenden Tagen (E14-16) mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO analysiert. Die Ergebnisse der qPCR für cFos und Fosb und Western Blot-Experimente für cFos sind in folgender Abbildung 34 zu sehen.



**Abbildung 34: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression der beiden IEGs cFos und Fosb *in vivo* nach einmaliger und dreimaliger intraperitonealer Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin in tragenden Mäusen (E16 beziehungsweise E14-E16).** A) RNA-Expression der Cortex-Samples der Gene Fosb und cFos nach einmaliger Injektion. B) RNA-Expression der Cortex-Samples der Gene Fosb und cFos nach drei Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. C) Quantifizierung des Western Blots von cFos nach einmaliger Injektion (siehe Abbildung E) mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. D) Quantifizierung des Western Blots von cFos nach dreimaliger Injektion (siehe Abbildung E) E) Western Blot der Cortex-Samples mit Banden von cFos (60 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Weder die qPCR- noch die Western Blot-Ergebnisse konnten den Effekt der primären Neuronen bestätigen. Sowohl nach einmaliger Injektion als auch nach drei Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Rapamycin konnte keine signifikante Veränderung von cFos respektive Fosb im Vergleich zu DMSO gefunden werden.

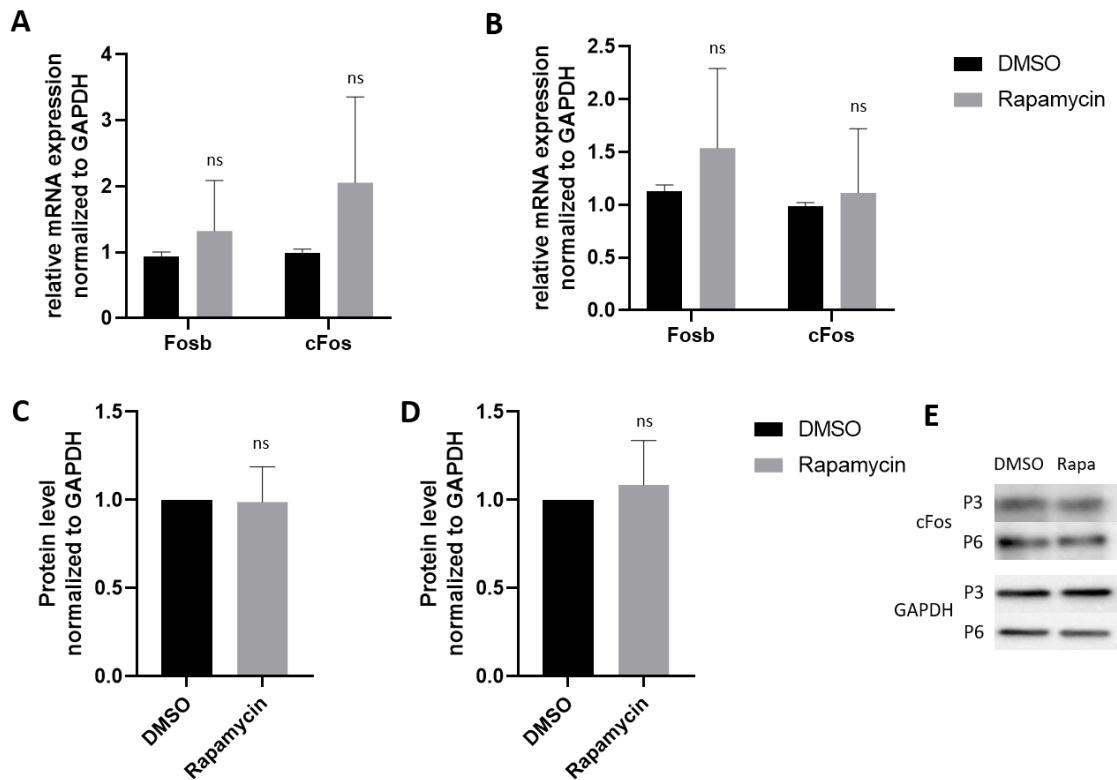
Als Nächstes wurden weitere Experimente *in vivo* durchgeführt. Hierbei wurden postnatale Tiere einmalig im Stadium P2 oder zweimalig in den Stadien P2 und P4 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin intraperitoneal injiziert. Analysiert wurden die jeweiligen Cortex-Samples nach einmaliger Injektion an P3 und nach zweimaliger Injektion an P6. Erneut wurde zunächst ein inhibitorischen Effekt von Rapamycin auf mTOR überprüft. Die Expressionsmuster von S6 und pS6 wurden anhand eines Western-Blots analysiert. Die folgende Abbildung 35 zeigt den inhibitorischen Effekt von Rapamycin *in vivo*.



**Abbildung 35: Quantifizierung der Proteinexpression von pS6 und S6 von Cortex-Proben der postnatalen Tiere im Stadium P3 24 Stunden nach intraperitonealer Rapamycin-Injektion (1 mg pro kg Körpergewicht) des Muttertiers.** A) Western Blot der Cortex-Samples mit Banden von pS6 und S6 (je 36 kDa) B) Quantifizierung des Western Blots von A mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Analyse von pS6 zeigt, dass die intraperitonealen Injektionen von Rapamycin der postnatalen Tiere erfolgreich durchgeführt werden konnten. Die Expression von pS6 liegt nach der Behandlung mit Rapamycin nur noch bei 10 % im Vergleich zu einer DMSO-Injektion.

Erneut wurde die Expression von cFos sowie Fosb stellvertretend für die IEGs auf RNA- und Proteinebene nach einmaliger Injektion im Stadium P2 und zweimaliger Injektion im Stadium P2 und P4 mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO analysiert. Die Ergebnisse der qPCR und Western Blot-Experimente für cFos sind in folgender Abbildung 36 zu sehen.



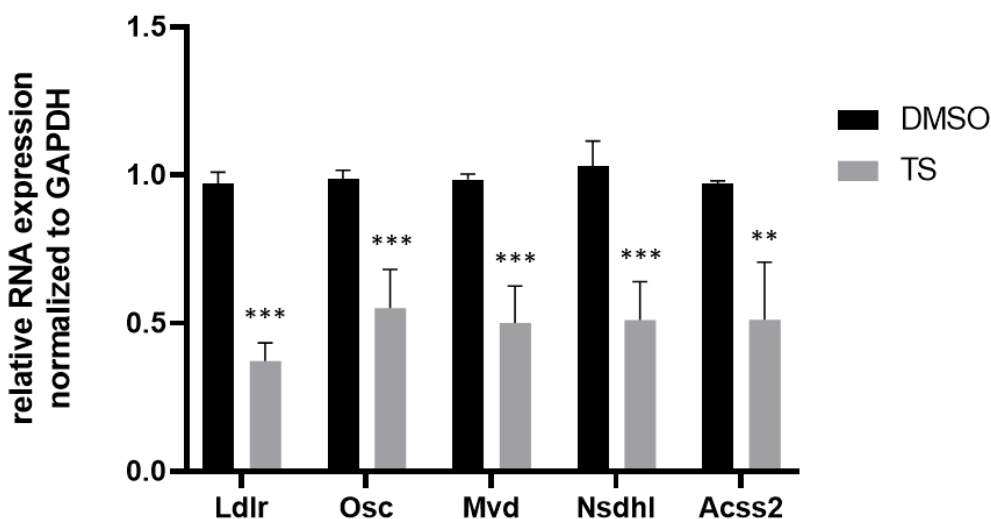
**Abbildung 36: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression der beiden IEGs cFos und Fosb *in vivo* nach einmaliger intraperitonealer Injektion an P2 und zweimaliger intraperitonealer Injektion an P2 und P4 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin in tragenden Mäusen.** A) RNA-Expression der Cortex-Samples der Gene Fosb und cFos 24 Stunden nach einmaliger Injektion im Stadium P2. B) RNA-Expression der Cortex-Samples der Gene Fosb und cFos 48 Stunden nach zweimaliger Injektion im Stadium P2 und P4. C) Quantifizierung des Western Blots von cFos nach einmaliger Injektion (siehe Abbildung E) mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. D) Quantifizierung des Western Blots von cFos nach zweimaliger Injektion (siehe Abbildung E) E) Western Blot der Cortex-Samples mit Banden von cFos (60 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Auch postnatal konnten weder die qPCR- noch die Western Blot-Ergebnisse den Effekt der primären Neuronen bestätigen. Sowohl im Stadium P3 nach einmaliger Injektion an P2 als auch im Stadium P6 nach zweimaliger Injektion an P2 und P4 mit Rapamycin konnte keine signifikante Veränderung von cFos respektive Fosb im Vergleich zu DMSO gefunden werden.

### 3.4.3 mTOR-Aktivität reguliert die Expression zahlreicher Gene des Cholesterinbiosynthesewegs in Neuronen und im sich entwickelnden zerebralen Cortex

#### 3.4.3.1 Validierung der Herunterregulation der Metabolismus-Gene

Um die herunterregulierten Gene der RNA-Sequenzierung zu validieren, wurden erneut qPCR Experimente durchgeführt. Hierbei wurden sowohl RNA-Proben verwendet, die für die RNA-Sequenzierung bereits genutzt wurden, als auch neue RNA-Proben von Temsirolimus behandelten primären Neuronen. Das Ergebnis aus einer Auswahl von Genen (Ldlr, Osc, Mvd, Nsdhl, Acss2) wird in Abbildung 37 gezeigt.



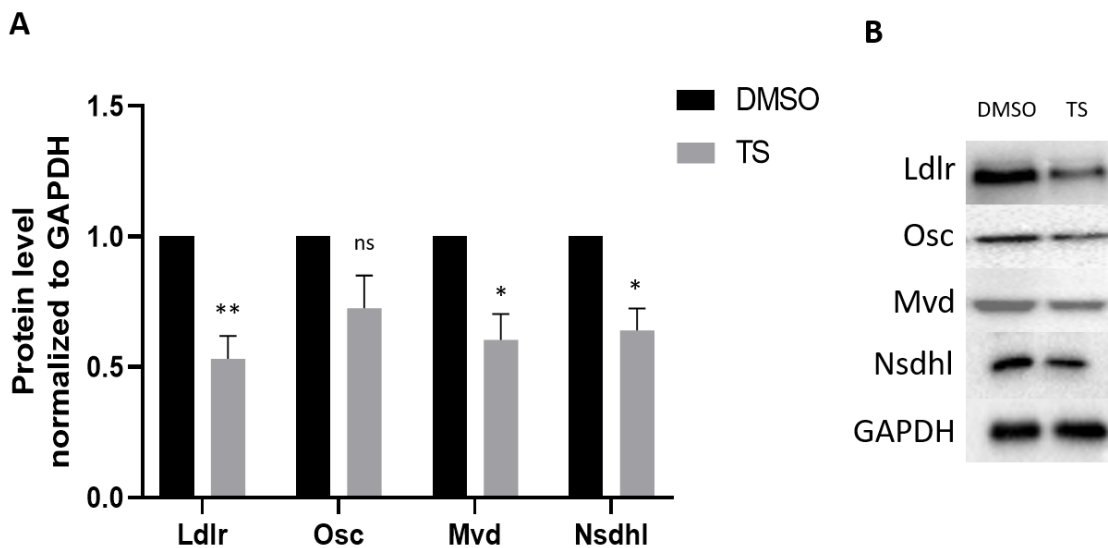
**Abbildung 37: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr, Osc, Mvd, Nsdhl und Acss2 nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für 5 Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.** Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Quantifizierung der qPCR zeigt, dass alle untersuchten Gene nach einer fünfständigen mTOR-Inhibition eine signifikante Reduktion ihrer Expression auf RNA-Ebene zeigen. Dabei zeigte sich zwischen den verschiedenen Genen eine Reduktion zwischen 40 % und 60 %. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung konnten für die herunterregulierten Gene nach Temsirolimus-Behandlung somit bestätigt werden.

#### 3.4.3.2 mTOR-Inhibition vermindert die Expression von Metabolismogenen auf Proteinebene

Als nächstes galt es die Reduktion dieser Gene auf Proteinebene zu überprüfen. Hierfür wurden primäre Neuronen für 24 Stunden mit Temsirolimus behandelt, Proteinlysate hergestellt und die Proteinexpression der metabolischen Zielgene Ldlr, Osc, Mvd und

Nsdhl mittels SDS-Page und Western Blot visualisiert. Eine Übersicht der Quantifizierung der Western Blots ist in der folgenden Abbildung 38 dargestellt.

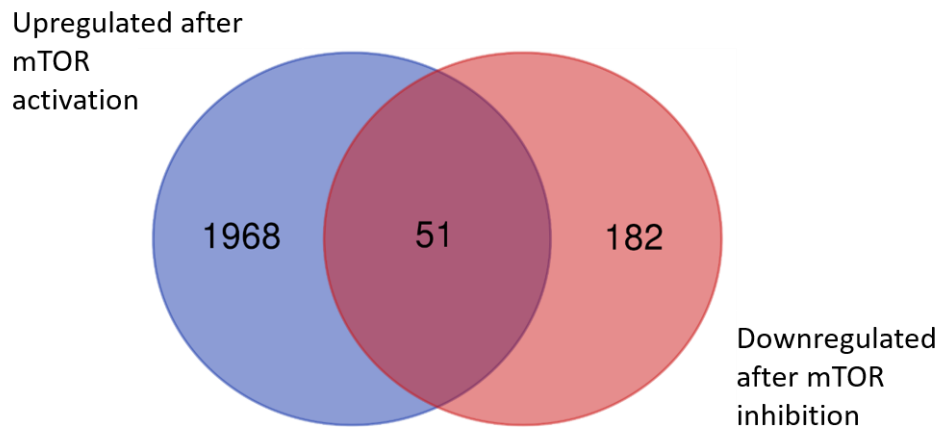


**Abbildung 38: Analyse der Proteinexpression von Ldlr, Osc, Mvd, Nsdhl und GAPDH in primären Neuronen (DIV7) nach Behandlung mit DMSO respektive Temozolomid für 24 Stunden.** A) Quantifizierung des Western Blots mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. B) Western Blot mit Banden von Ldlr (135 kDa), Osc (60 kDa), Mvd (43 kDa), Nsdhl (50 kDa) und GAPDH (36 kDa) Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Quantifizierung der Western Blot-Experimente zeigt eine Reduktion der Zielgene. Während Ldlr, Mvd und Nsdhl eine Reduktion zwischen 40 % und 50 % zeigen, ist bei Osc lediglich eine Tendenz (p-Wert 0,09) eines Rückgangs der Proteinexpression zu beobachten. Dennoch konnte insgesamt die Reduktion auf Proteinebene bestätigt werden.

### 3.4.3.3 Vergleich zu bereits publizierten Daten

Um die erlangten Ergebnisse zu bestätigen wurden diese im nächsten Schritt mit der bislang veröffentlichten Literatur verglichen. Nach einem Abgleich der Daten mit bereits publizierten Daten (Düvel et al., 2010), konnten wir unter den herunterregulierten Genen eine Übereinstimmung zu Genen finden, die in mTOR hyperaktiven Fibroblasten von Mäusen hochreguliert vorliegen. Durch eine *TSC2*-Mutation in den Fibroblasten, ist der mTOR Signalweg in diesen Zellen hyperaktiv. Daher wurden die Gene, die nach einer Inhibition von mTOR herunterreguliert sind, mit denen verglichen, die bei einer Aktivierung von mTOR hochreguliert vorliegen. Das Venn-Diagramm in folgender Abbildung (Abb. 39) zeigt die Überschneidung dieser beiden Datensätze.

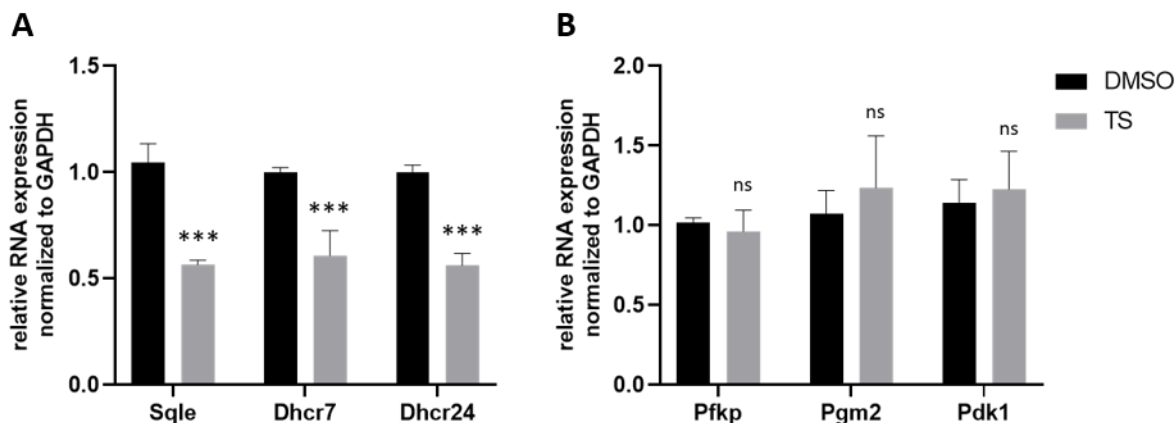


**Abbildung 39: Venn-Diagramm über die herunterregulierten Gene nach mTOR-Inhibition und der durch mTOR Aktivierung hochregulierten Gene.** Gezeigt wird die Überschneidung der Gene, die nach der hier durchgeführten fünfständigen Behandlung mit Temsirolimus reduziert vorliegen und der Gene, welche nach einer Aktivierung von mTOR hochreguliert vorliegen (Düvel et al., 2010).

Unter den insgesamt 233 herunterregulierten Genen, die nach einer 5-stündigen mTOR Inhibition gefunden wurden, wurde eine Übereinstimmung von 51 Genen zu den hochregulierten Genen in den hyperaktiven mTOR Fibroblasten gefunden.

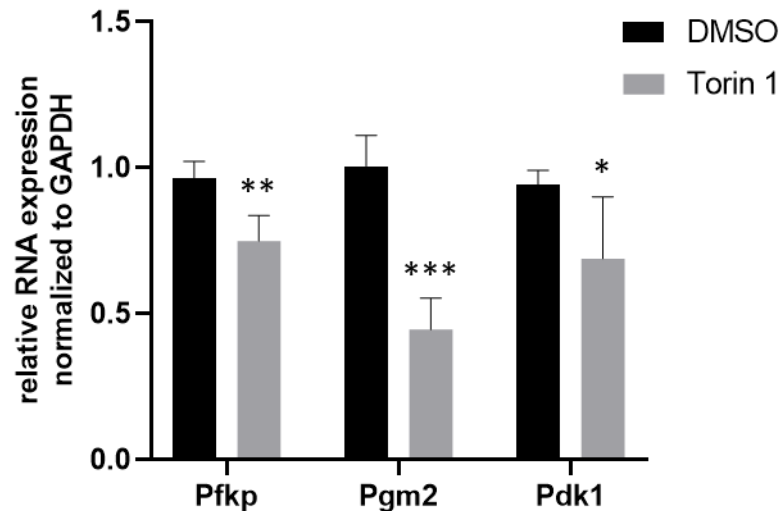
#### **3.4.3.4 Expressionsmuster von Genen des Cholesterin-Stoffwechsels und der Glykolyse**

Auf der Suche nach Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschieden der beiden Datensätze haben wir zwei Stoffwechselwege genauer untersucht. In der Arbeit von Düvel et al. sind Gene, die für die Glykolyse und den Cholesterin-Stoffwechsel wichtig sind, hochreguliert. Für eine Untersuchung der Expression dieser Gene in den primären Neuronen nach mTOR Inhibition, wurden je drei Gene der Glykolyse (Pfkf, Pgm2 und Pdk1) und drei Gene des Cholesterin-Stoffwechsels (Sqle, Dhcr7 und Dhcr24) ausgewählt. Die Gene der Glykolyse waren in den RNA-Seq Daten nicht signifikant verändert, während Gene des Cholesterinstoffwechsels signifikant reduziert exprimiert vorlagen. Nach einer fünfständigen Behandlung mit Temsirolimus wurde die RNA isoliert und die Expression mittels qPCR ermittelt. Folgende Abbildung (Abb. 40) zeigt die Ergebnisse der Expression der Gene beider Stoffwechselwege.



**Abbildung 40: Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges und der Glykolyse nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qPCR und Excel.** A) RNA-Expression der Cholesterin-Stoffwechselgene Sqle, Dhcr7 und Dhcr24 nach mTOR Inhibition B) RNA-Expression der Glykolyse-Gene Pfkp, Pgm2 und Pdk1 nach mTOR Inhibition Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

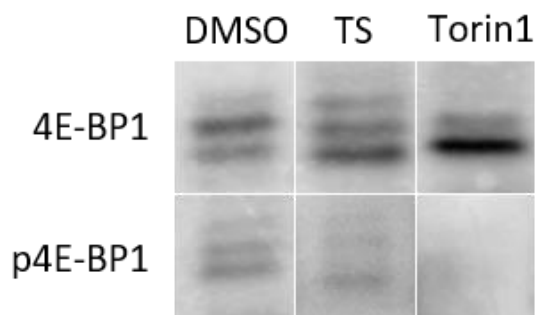
Die Quantifizierung in Abbildung 40 A zeigt, dass die Expression der Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges in den primären Neuronen nach mTOR Inhibition signifikant herunterreguliert ist, während die Gene der Glykolyse keine signifikanten Veränderungen zeigen (siehe Abb. 40 B). So ist die Expression der drei Gene des Cholesterin-Stoffwechselwegs Sqle, Dhcr7 und Dhcr24 nach der Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zur DMSO-Kontrolle um etwa 40 % - 50 % reduziert. Die Glykolyse-Gene Pfkp, Pgm2 und Pdk1 zeigen dagegen keine Veränderung. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen zellspezifischen oder inhibitorspezifischen Effekt handelt, wurden primäre Neurone statt mit Temsirolimus mit Torin1 behandelt. Torin1 inhibiert hierbei nicht nur mTORC1, sondern im Gegensatz zu Temsirolimus auch mTORC2. Auch hier wurden die primären Neurone nach einer fünfstündigen Behandlung geerntet, die RNA isoliert und die Expression der ausgewählten Gene der Glykolyse mit Hilfe von qPCR analysiert. Folgende Abbildung 41 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.



**Abbildung 41:** Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Gene der Glykolyse (Pfkf, Pgm2 und Pdk1) nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Torin 1 für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Quantifizierung der qPCR Experimente zeigt, dass die drei Gene der Glykolyse nach der Behandlung mit Torin 1 signifikant reduziert exprimiert werden. Eine Rolle von mTORC2 in der Regulation der Gene der Glykolyse könnte der Grund für die Reduktion nach Behandlung mit Torin 1 sein.

Torin1 ist zusätzlich bekannt dafür die Phosphorylierung von 4E-BP1 im Vergleich zu Temsirolimus deutlich stärker zu reduzieren. Um einen Unterschied in der Expression von 4E-BP1 und phospho 4EBP1 (p4E-BP1) zu erörtern, wurden mit Temsirolimus und Torin 1 behandelte primäre Neuronen geerntet, Proteine isoliert und die Expression anhand Western Blot Experimente analysiert. Die Blots dieser beiden Antikörper sind in folgender Abbildung (Abb. 42) zu sehen.

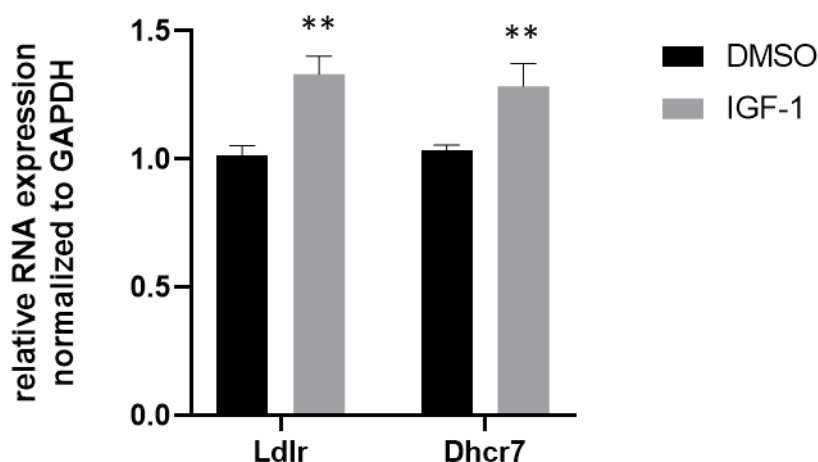


**Abbildung 42:** Western Blot der primären Neuronen fünf Stunden nach DMSO, Temsirolimus beziehungsweise Torin1-Behandlung mit Banden von 4E-BP1 und p4E-BP1 (ca 18 kDa).

Anhand dieser Abbildung ist zu sehen, dass zum einen eine dritte Bande von 4E-BP1, die nach Behandlung mit Temsirolimus auftaucht, nach einer Behandlung mit Torin 1 nicht mehr zu sehen ist, als auch zum zweiten, dass eine Phosphorylierung nur nach einer Behandlung mit Temsirolimus zustande kommt. Torin1 scheint im Gegensatz zu Temsirolimus also eine Phosphorylierung von 4E-BP1 zu verhindern. Zudem ist kein Unterschied zwischen DMSO und Temsirolimus festzustellen. Aufgrund der marginalen Unterschiede speziell bei p4E-BP1 und der räumlichen Nähe der Banden zueinander, war eine Quantifizierung in diesem Fall leider nicht möglich.

### 3.4.3.5 Die Aktivierung von mTOR erhöht die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene

Um einen gegenteiligen Effekt durch eine Aktivierung von mTOR zu untersuchen, wurden primäre corticale Neuronen mit IGF-1 behandelt. IGF-1 wirkt hierbei durch seine Eigenschaft als Wachstumsfaktor aktivierend auf mTOR. Zur Überprüfung wurden erste qPCR Experimente nach einer Behandlung mit DMSO respektive IGF-1 für 5 Stunden durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse der beiden Gene Ldlr und Dhcr7 ist in Abbildung 43 dargestellt.

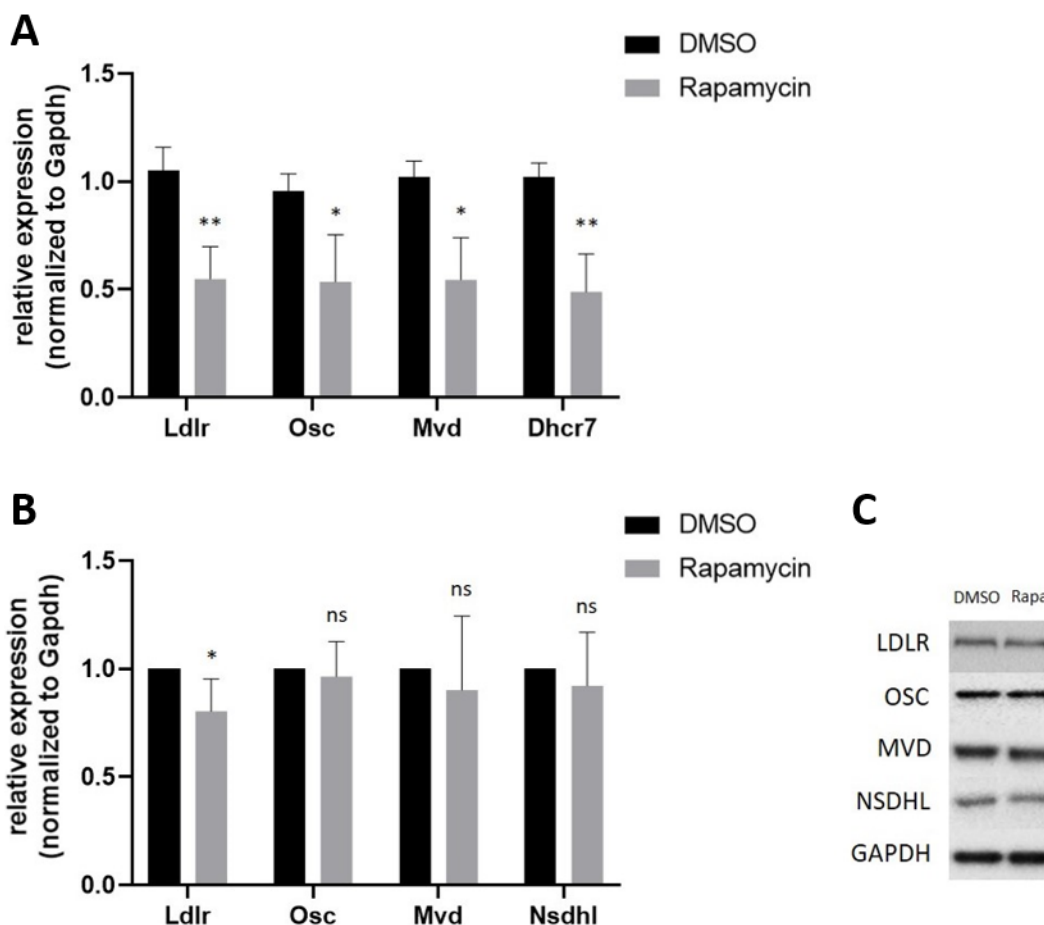


**Abbildung 43: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr und Dhcr7 nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise IGF-1 für fünf Stunden in primären Neuronen (DIV7) mittels qRT-PCR und Excel.** Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die Quantifizierung der beiden Gene zeigt, dass deren Expression in den primären Neuronen nach einer Aktivierung von mTOR erhöht vorliegt. Sowohl die Expression von Ldlr als auch die von Dhcr7 steigt um etwa 25 %. Diese Experimente weisen darauf hin, dass die Reduktion der Cholesterin-Gene nach der Inhibierung von mTOR tatsächlich in der reduzierten mTOR-Aktivität begründet liegt.

### 3.4.3.6 mTOR reguliert die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene *in vivo* im sich entwickelnden zerebralen Cortex

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass mTOR die Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene *in vitro* in primären Neuronen reguliert, sollte hier überprüft werden, ob diese Regulation auch *in vivo* stattfindet. Dafür wurden zunächst wie unter 3.4.2.6 bereits beschrieben tragende Mäuse im Stadium E16.5 intraperitoneal mit Rapamycin injiziert. Zunächst wurde die Expression der Gene, die in den Temsirolimus behandelten Neuronen herunterreguliert vorlagen, auf RNA- und Proteinebene 24 Stunden nach der Injektion mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO analysiert. Die Ergebnisse der qPCR und Western Blot-Experimente für die Gene Ldlr, Osc, Mvd und Dhcr7 beziehungsweise Nsdhl sind in folgender Abbildung 44 zu sehen.

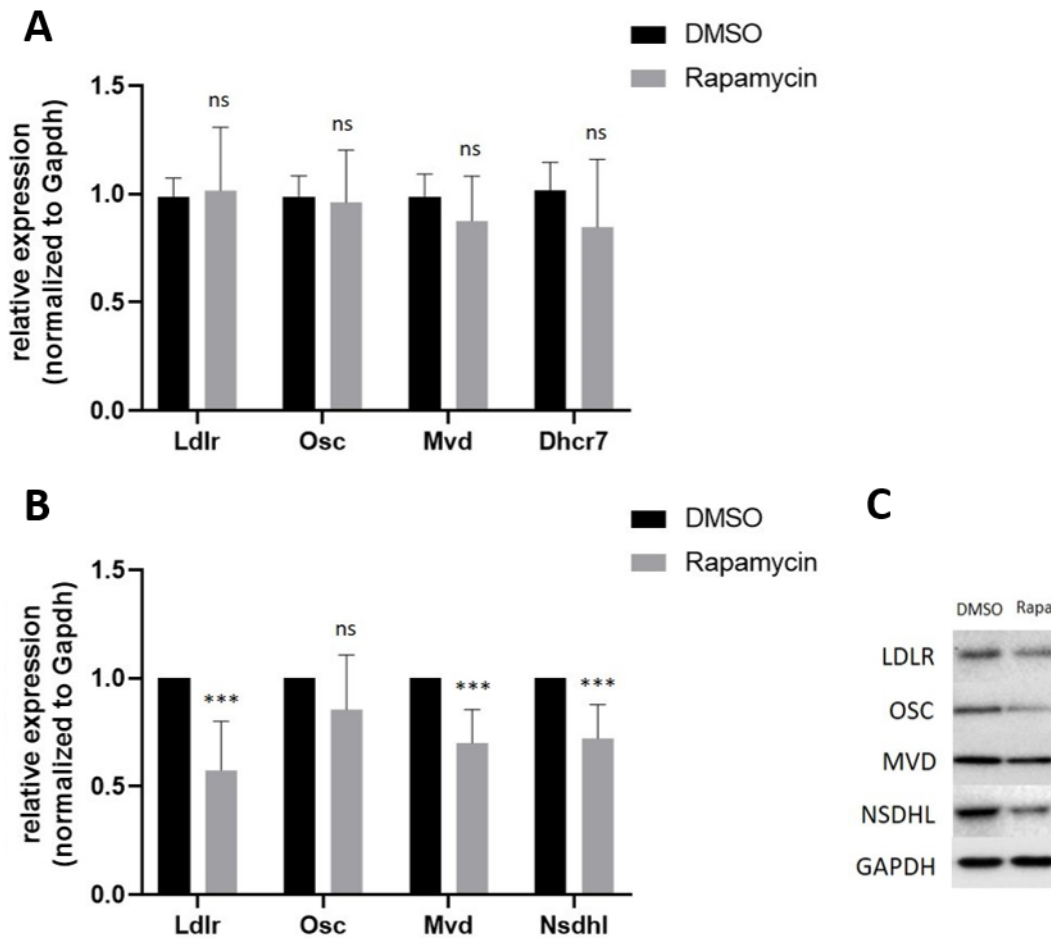


**Abbildung 44: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges nach intraperitonealer Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin für 24 Stunden in tragenden Mäusen (E16).** A) RNA-Expression der Cortex-Samples der Gene Ldlr, Osc, Mvd und Dhcr7. B) Quantifizierung des Western Blots von C mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. C) Western Blot der Cortex-Samples mit Banden von Ldlr (135 kDa), Osc (60 kDa), Mvd (43 kDa), Nsdhl (50 kDa) und GAPDH (36 kDa) Zur statistischen Auswertung wurden sechs

biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Die qPCR Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Gene *Ldlr*, *Osc*, *Mvd* und *Dhcr7* auf RNA-Ebene um etwa 50 %. Auf Proteinebene konnte lediglich für *Ldlr* eine Reduktion (20 %) nach der Injektion mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO aufgezeigt werden. Für *Osc*, *Mvd* und *Nsdhl* konnte zwar eine Tendenz, jedoch keine signifikante Reduktion nach einer Behandlung mit Rapamycin gezeigt werden.

Der geringe Effekt auf Proteinebene könnte durch die Proteinstabilität der entsprechenden Proteine bedingt sein. Daher wurde als nächster Schritt Rapamycin an drei aufeinanderfolgenden Tagen in den Stadien E14.5 – E16.5 injiziert. Erneut wurden im Anschluss die genannten Gene hinsichtlich ihrer RNA- und Proteinexpression mit Hilfe von qPCR und Western Blot-Experimenten analysiert. Die Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.

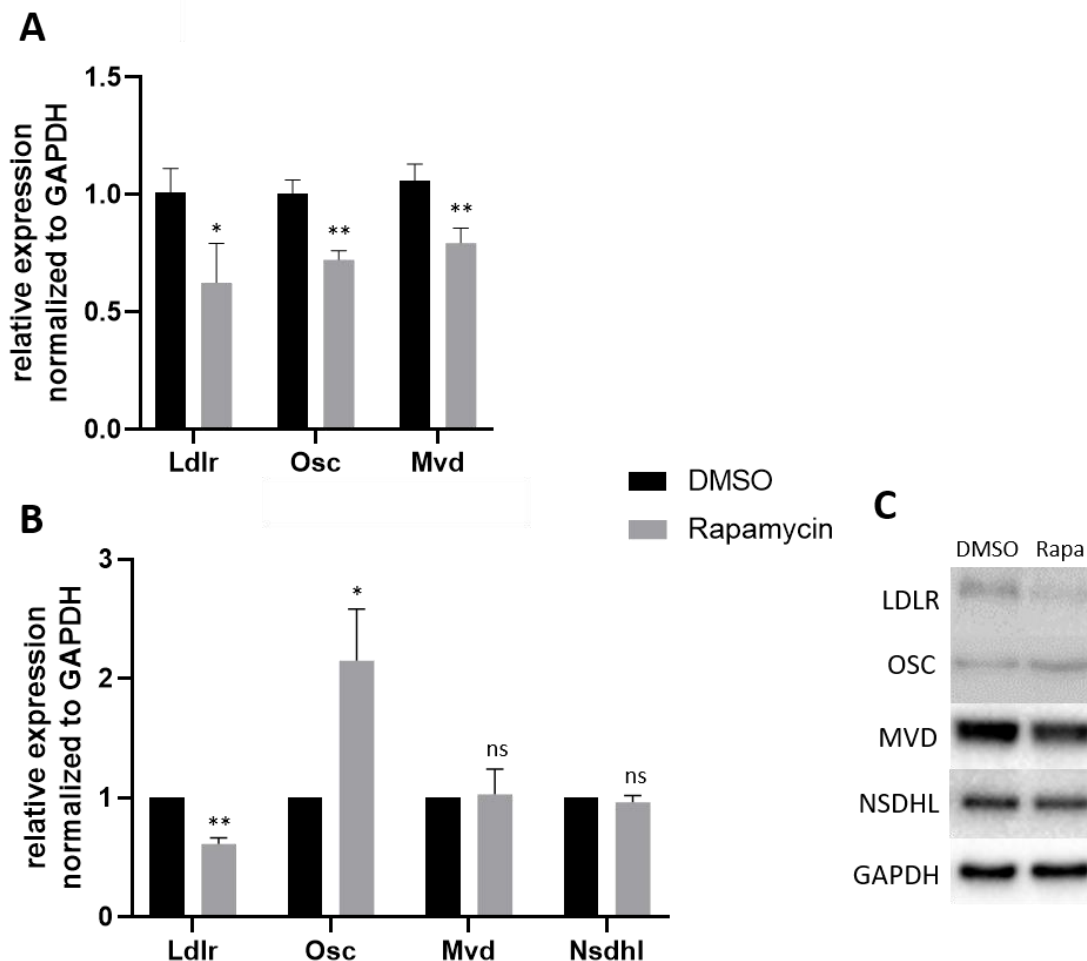


**Abbildung 45: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges nach intraperitonealer Injektion mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht) an drei aufeinanderfolgenden Tagen in tragenden Mäusen (E14.5-E16.5).** A) RNA-Expression der Gene Ldlr, Osc, Mvd und Dhcr7 in den embryonalen Cortex-Proben. B) Quantifizierung des Western Blots von B mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. C) Western Blot der Cortex-Proben mit Banden von Ldlr (135 kDa), Osc (60 kDa), Mvd (43 kDa), Nsdhl (50 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden sechs biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Nach drei Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen zeigen die Gene Ldlr, Osc, Mvd und Dhcr7 einen Rückgang ihrer RNA-Expression auf ihr Normalniveau und damit keine signifikante Veränderung zu DMSO. Im Gegensatz dazu sind nun drei der vier untersuchten Gene (Ldlr, Mvd und Nsdhl) auf Proteinebene signifikant reduziert. Ldlr wird hierbei um 45 %, Mvd um 30 % und Nsdhl um 25 % reduziert. Die Proteinexpression von Osc zeigt eine Tendenz (p-Wert 0,105) zur Reduktion, aber keine signifikante Veränderung.

Analog zu den *in vivo*-Untersuchungen der IEGs wurden für die Cholesterinbiosynthese-Gene ebenfalls Analysen an P3 nach einmaliger intraperitonealer Injektion an P2 mit

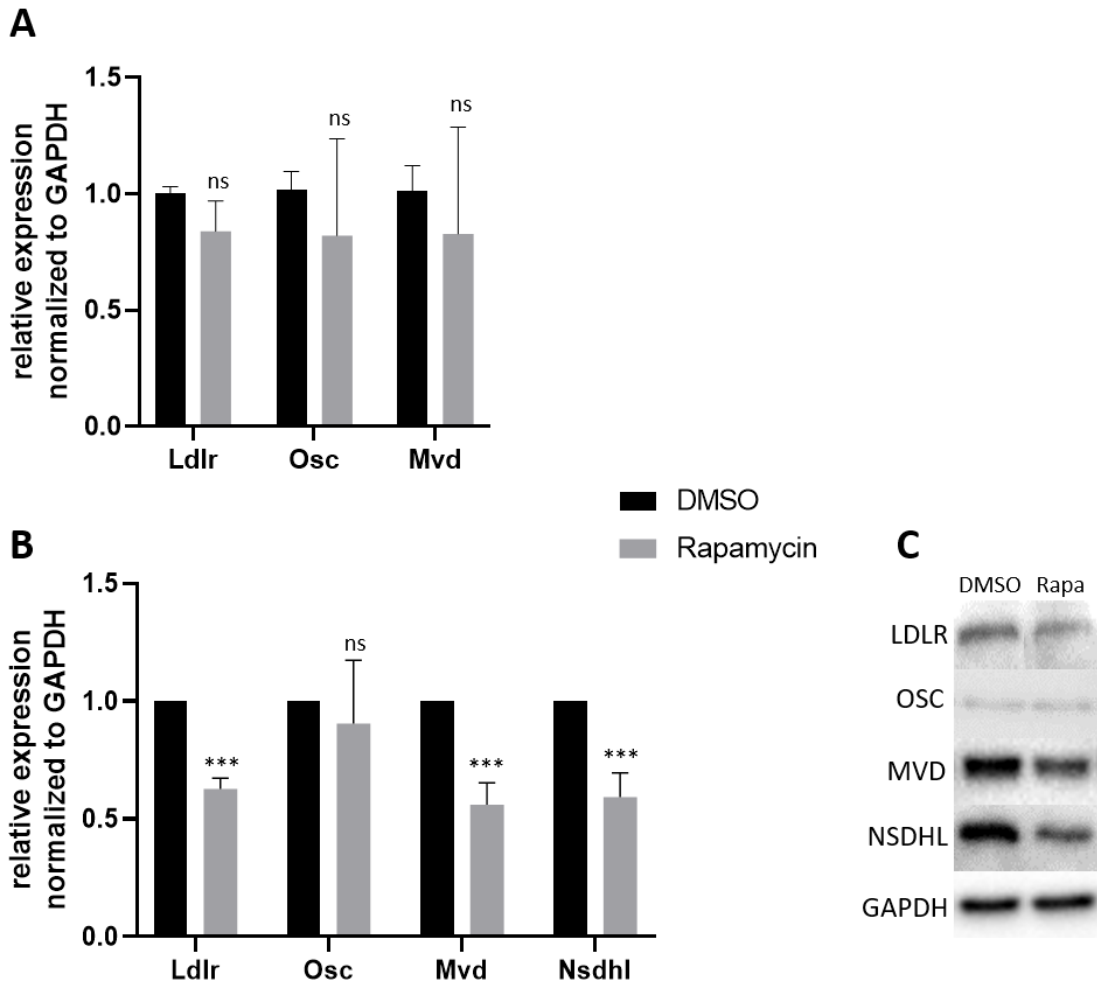
DMSO beziehungsweise Rapamycin angestellt. Die Ergebnisse der qPCR und Western Blot-Experimente für die Gene Ldlr, Osc, Mvd und Nsdhl sind in folgender Abbildung 46 zu sehen



**Abbildung 46: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion im Stadium P2 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht).** A) RNA-Expression der Gene Ldlr, Osc und Mvd in den Cortex-Proben. B) Quantifizierung des Western Blots von C mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. C) Western Blot der Cortex-Proben mit Banden von Ldlr (135 kDa), Osc (60 kDa), Mvd (43 kDa), Nsdhl (50 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Die qPCR Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion der Gene Ldlr, Osc und Mvd auf RNA-Ebene um 40 % für Ldlr und um etwa 30 % für Osc und Mvd. Auf Proteinebene konnte lediglich für Ldlr eine Reduktion (30 %) nach der Injektion mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO aufgezeigt werden. Für Osc wurde eine signifikant erhöhte Expression festgestellt. Mvd und Nsdhl zeigten keine Veränderung in ihrer Expression nach einer Behandlung mit Rapamycin im Vergleich zu DMSO.

Erneut wurde eine verlängerte Behandlung mit Rapamycin eingeleitet. Hierfür wurden postnatale Mäuse in den Stadien P2 und P4 mit Rapamycin intraperitoneal behandelt und im Stadium P6 analysiert. Abermals wurden im Anschluss die genannten Gene hinsichtlich ihrer RNA- und Proteinexpression mit Hilfe von qPCR und Western Blot-Experimenten analysiert. Die Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.



**Abbildung 47: Quantifizierung der mRNA- und Protein-Expression verschiedener Gene des Cholesterin-Stoffwechselweges 48 Stunden nach zweimaliger intraperitonealer Injektion in den Stadien P2 und P4 mit DMSO beziehungsweise Rapamycin (1 mg pro kg Körpergewicht). A) RNA-Expression der Gene Ldlr, Osc und Mvd in den Cortex-Proben. B) Quantifizierung des Western Blots von C mit Hilfe von ImageJ, Image Lab und Microsoft Excel. C) Western Blot der Cortex-Proben mit Banden von Ldlr (135 kDa), Osc (60 kDa), Mvd (43 kDa), Nsdhl (50 kDa) und GAPDH (36 kDa). Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.**

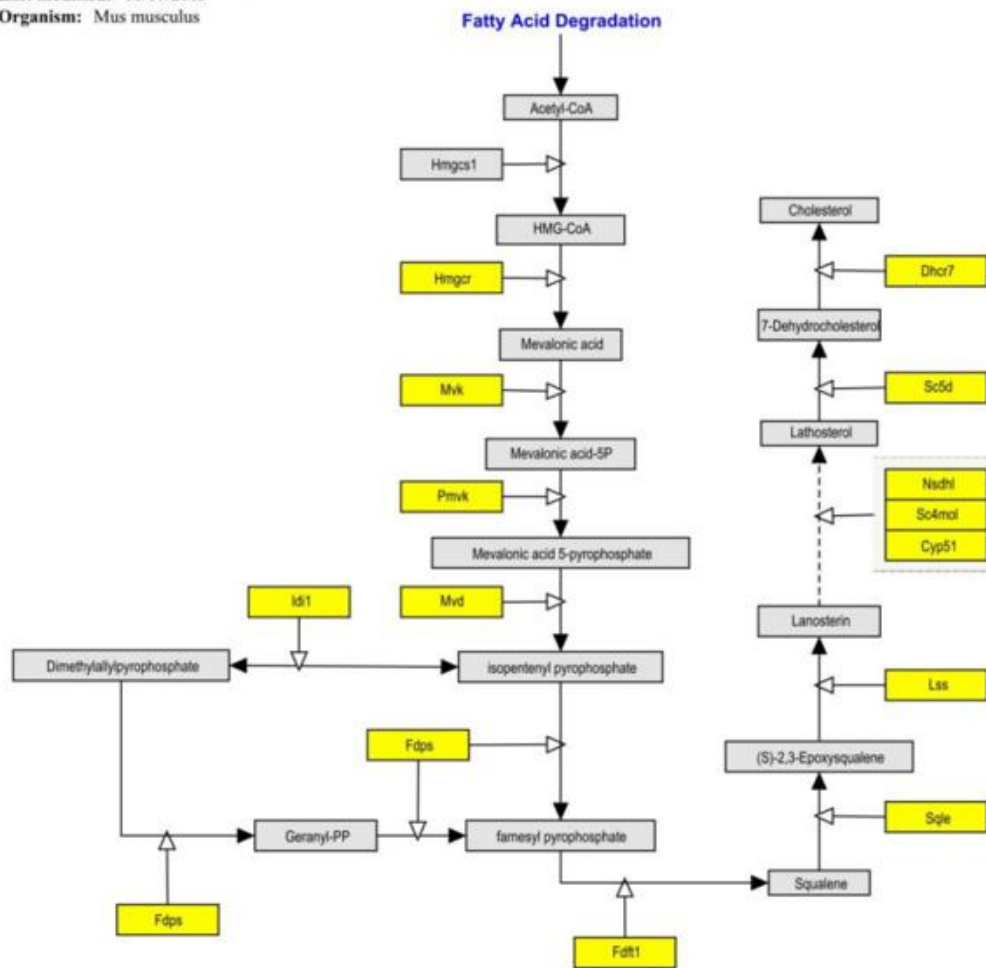
Nach zweimaliger intraperitonealer Injektion zeigen die Gene Ldlr, Osc und Mvd einen Rückgang ihrer RNA-Expression auf ihr Normalniveau und damit keine signifikante Veränderung zu DMSO. Im Gegensatz dazu sind nun drei der vier untersuchten Gene (Ldlr, Mvd und Nsdhl) auf Proteinebene signifikant reduziert. Ldlr und Nsdhl werden

hierbei um 40 % und Mvd um 45 % reduziert. Die Proteinexpression von Osc zeigt im Vergleich dazu keine signifikante Veränderung.

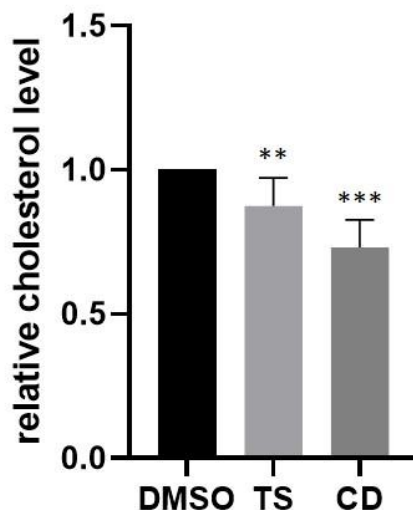
#### **3.4.3.7 mTOR-Inhibition hemmt die Cholesterin-Synthese in primären Neuronen**

Die Experimente *in vitro* zeigten, dass nach einer Behandlung mit Temsirolimus für 5 Stunden bereits 8, bei 24 Stunden sogar 15 Gene des Cholesterin-Biosynthesewegs in ihrer Expression signifikant herunterreguliert vorliegen (siehe Abb. 48). Wir erwarteten daher eine beeinträchtigte Cholesterinbiosynthese nach der Inhibierung des mTOR Signalwegs mittels Temsirolimus. Um diese These zu prüfen, wurden zunächst Neuronen für 48 Stunden mit DMSO bzw. Temsirolimus behandelt und anschließend der Cholesteringehalt der Zellen mit Hilfe des Amplex Red Cholesterin-Assays gemessen. Als Positivkontrolle wurde Cyclodextrin verwendet. Die Ergebnisse dieses Assays sind in Abbildung 49 aufgezeigt.

**Title:** Cholesterol Biosynthesis  
**Last modified:** 10/17/2013 1-7  
**Organism:** Mus musculus



**Abbildung 48: Schematische Übersicht des Cholesterinsynthesewegs in der Maus.** Gene, die in der RNA-Sequenzierung nach 24-stündiger Behandlung mit Temsirolimus als herunterreguliert identifiziert wurden, sind in Gelb markiert.



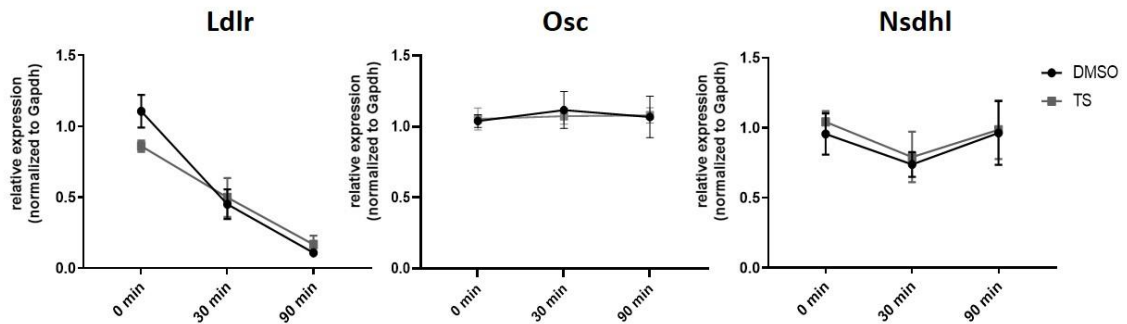
**Abbildung 49: Veränderungen im Cholesteringehalt in primären Neuronen (DIV6) mittels Amplex Red Cholesterol Assay nach Behandlung mit DMSO respektive Temsirolimus für 24 Stunden oder Cyclodextrin (CD) für eine Stunde.** Zur statistischen Auswertung wurden fünf biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Im Vergleich zu DMSO war der Cholesteringehalt in Temsirolimus behandelten Neuronen etwa um 15 % signifikant reduziert. Zusätzlich war der Cholesteringehalt nach einer Behandlung mit Cyclodextrin (CD) um etwa 30 % reduziert. Die Positivkontrolle Cyclodextrin ist in der Lage Cholesterin aus den Zellen zu binden und den Cholesteringehalt der Zellen somit zu senken. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine Hypoaktivität des mTOR Signalwegs *in vitro* zu einer reduzierten Cholesterinbiosynthese führt.

#### **3.4.3.8 Mechanismus der mTOR abhängigen Regulation von Genen des Cholesterin-Stoffwechsels**

Veränderungen der RNA-Expression können auf epigenetischer Ebene durch Änderung der Zugänglichkeit des Chromatins, auf Transkriptionsebene durch Veränderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren oder auf posttranskriptioneller Ebene durch Änderung der RNA-Stabilität erfolgen.

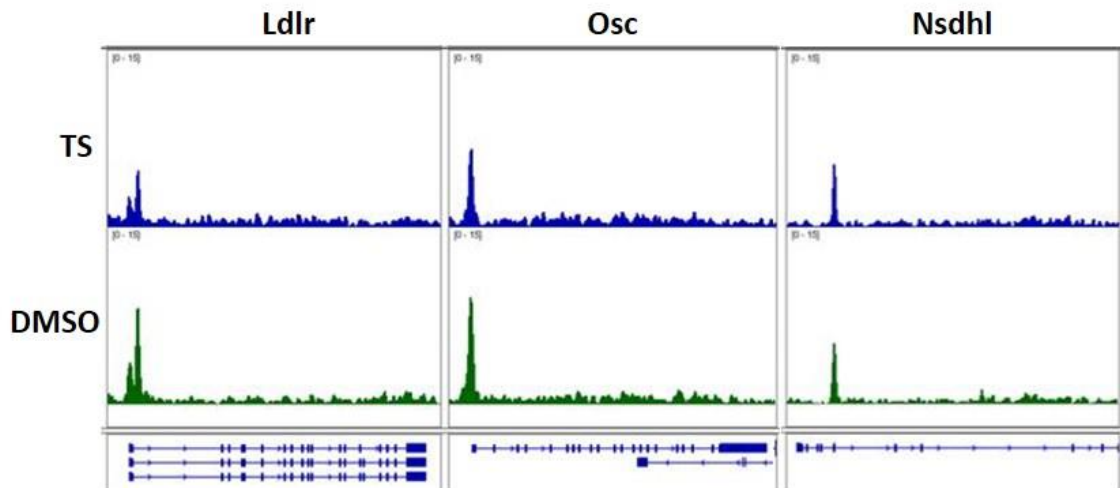
Um mögliche Veränderungen der RNA-Stabilität zu untersuchen, wurden primäre Neuronen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D in Kombination mit DMSO oder Temsirolimus behandelt. Mittels qPCR-Analysen wurde die RNA-Zerfallsrate der drei herunterregulierten Gene *Ldlr*, *Osc* und *Nsdhl* untersucht. Die folgende Abbildung 50 zeigt das Ergebnis dieser Experimente.



**Abbildung 50: Quantifizierung der mRNA-Expression von Ldlr, Osc und Nsdhl nach Behandlung mit DMSO respektive Temeirolimus plus Actinomycin D in primären Neuronen (DIV7).** Quantifizierung der mRNA-Stabilität von Ldlr, Osc und Nsdhl nach Behandlung mit DMSO beziehungsweise Temeirolimus und Actinomycin D nach den Zeitpunkten 0 Minuten, 30 Minuten und 90 Minuten mittels qPCR. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, zeigt keines der drei Gene nach einer Inhibierung des mTOR Signalwegs eine Veränderung seiner RNA-Stabilität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mTOR unter diesen experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation der RNA-Expression dieser Gene hat.

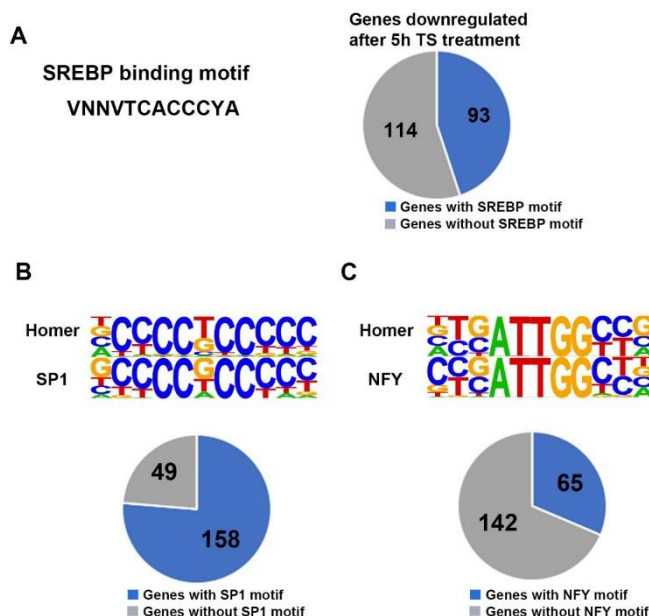
Um auf mögliche mTOR-vermittelte Änderungen der Zugänglichkeit des Chromatins zu testen, wurde als nächster Schritt ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) durchgeführt. Hierfür wurden corticale Neuronen erneut für 5 Stunden mit DMSO oder Temeirolimus behandelt und im Anschluss das Chromatin untersucht. Die Analyse der drei nach Temeirolimus reduziert vorliegenden Gene Ldlr, Osc und Nsdhl ist in folgender Abbildung 51 aufgezeigt.



**Abbildung 51:** Veränderungen der Chromatin-Zugänglichkeit der Gene Ldlr, Osc und Nsdhl nach Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus für 24 Stunden mittels ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing).

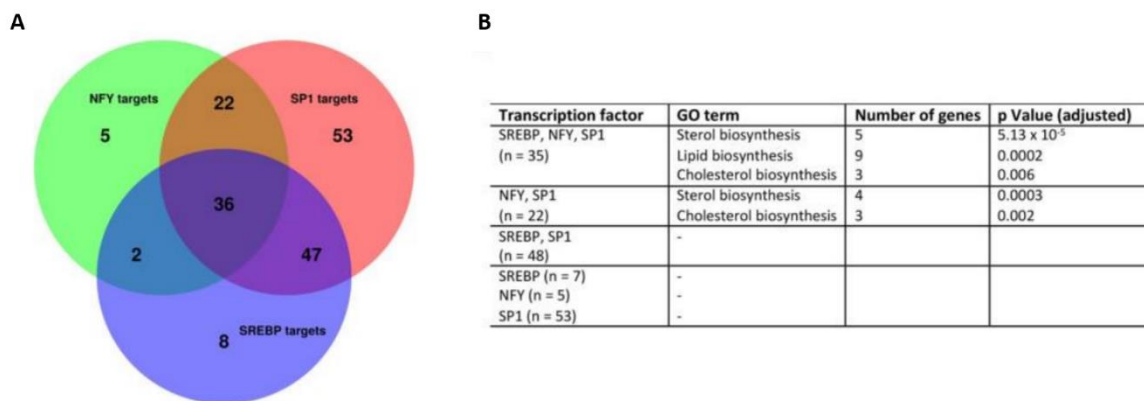
Beim Vergleich offener Chromatinregionen der drei Gene Ldlr, Osc und Nsdhl konnten nach der Behandlung von Neuronen mit DMSO und Temsirolimus keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Modifikationen der Zugänglichkeit des Chromatins keine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Genexpressionsänderungen nach Temsirolimus-Behandlung spielen. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die durch mTOR vermittelte Aktivierung der Genexpression in Neuronen direkt auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren erfolgt.

Um eine Änderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren zu überprüfen, wurden zunächst Transkriptionsfaktor-Bindestellen in den Promotorregionen der herunterregulierten Gene identifiziert. Hierbei wurden die Promotorregionen der nach fünfständiger Temsirolimus-Behandlung herunterregulierten Gene mittels der Softwares FindM und Homer (Ambrosini et al., 2003; Heinz et al., 2010) untersucht.



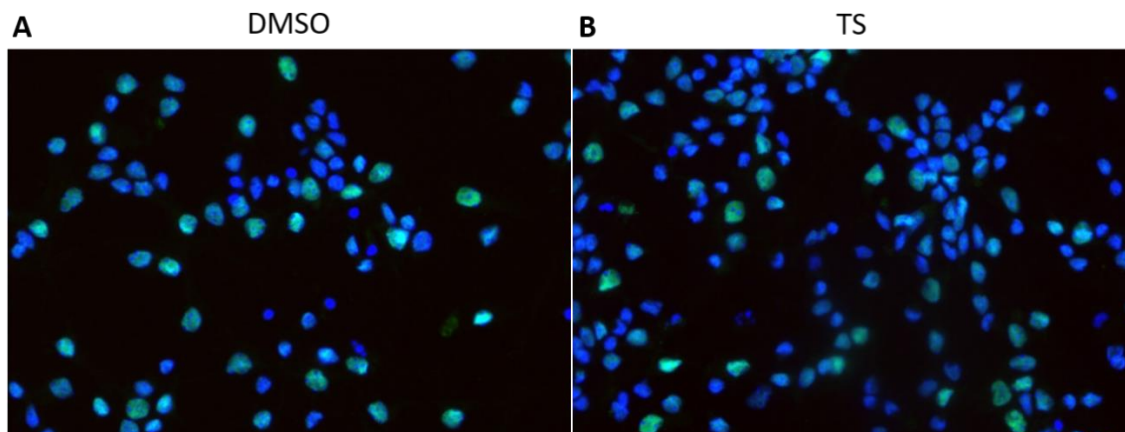
**Abbildung 52: Analyse der Bindung von Transkriptionsfaktoren in Neuronen nach mTOR-Inhibition.** A) Venn Diagramm der Gene, die nach Temsirolimus-Behandlung reduziert vorliegen und eine SREBP-Bindestelle aufweisen. B) Venn Diagramm der Gene, die nach Temsirolimus-Behandlung reduziert vorliegen und eine SP1-Bindestelle aufweisen. C) Venn Diagramm der Gene, die nach Temsirolimus-Behandlung reduziert vorliegen und eine NF-Y-Bindestelle aufweisen.

Düvel und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die Bindestelle für SREBPs in den Promotoren von mTOR-regulierten Zielgenen überrepräsentiert vorliegt. Nach Untersuchung der Promoter-Regionen der nach fünfstündiger mTOR-Inhibition herunterregulierten Gene mit Hilfe der findM-Software (Quelle) konnte gezeigt werden, dass 45 % dieser Gene mindestens eine Bindestelle für SREBP besitzen (Abb. 52 A). Zusätzlich konnten wir mit Hilfe der Software Homer herausfinden, dass für die Transkriptionsfaktoren SP1 in 76,3 % (Abb. 52 B) und für NF-Y in 31,4 % (Abb. 52 C) der Promotoren der herunterregulierten Gene Bindestellen vorliegen. SREBP1 ist für sich ein schwacher transkriptioneller Aktivator und interagiert daher mit den Interaktionspartnern SP1 und NF-Y (Reed et al., 2008). Die Identifizierung von angereicherten GO-Terms ergab, dass Gene, welche am Cholesterin-Biosyntheseweg beteiligt sind, bevorzugt Bindestellen für alle drei Transkriptionsfaktoren (SREBP, NF-Y und SP1) oder für zwei Transkriptionsfaktoren (NF-Y und SP1) in ihren Promotoren enthielten (siehe Abb. 53 A).



**Abbildung 53: Transkriptionsfaktoren, die Bindestellen in den herunterregulierten Genen aufweisen.** A) Venn-Diagramm, das herunterregulierte Gene zeigt, die Bindungsstellen für zwei oder drei der Transkriptionsfaktoren SREBP, SP1 und NF-Y in ihren Promotoren teilen. B) GO-Term-Analyse der Gene, die unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktor-Bindestellen in ihren Promotoren enthalten.

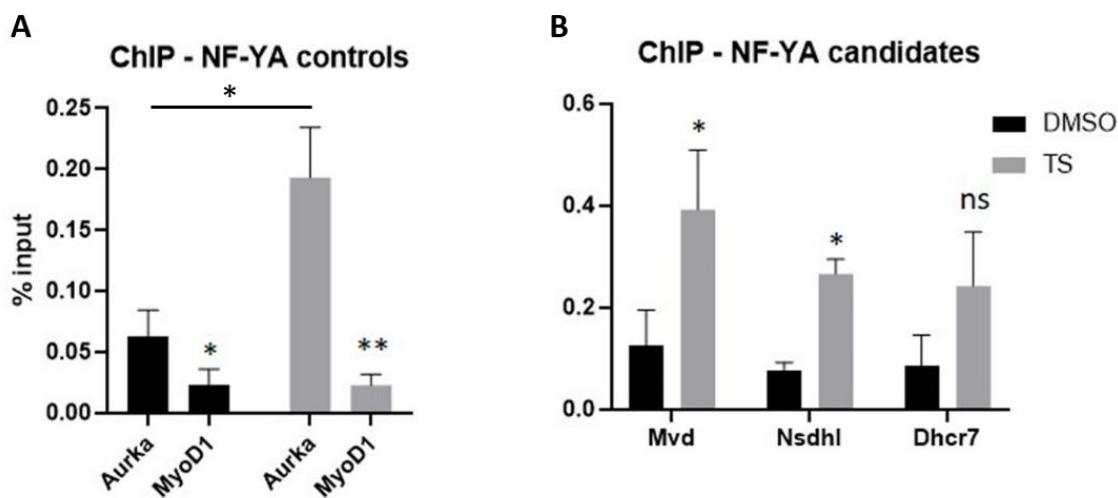
Aufgrund dieser Ergebnisse und der Grundlage, dass bisher wenig über die Verbindung von mTOR-Aktivität und NF-Y bekannt ist, wurde NF-Y genauer untersucht. Beim NF-Y-Komplex handelt es sich um ein Trimer das aus NF-YA, NF-YB und NF-YC besteht. Da NF-YA für die Bindung mit Promotorregionen anderer Ziele verantwortlich ist, wurde NF-YA stellvertretend für den NF-Y-Komplex näher untersucht. NF-YA ist hauptsächlich im Nucleus lokalisiert. Zunächst wurde überprüft, ob sich die subzelluläre Lokalisierung nach Behandlung mit Temsirolimus ändert. Hierfür wurden primäre Neuronen für 5 Stunden mit DMSO respektive Temsirolimus behandelt und NF-YA nach Fixierung auf Deckgläschen mittels Immunfärbung visualisiert. Abbildung 54 zeigt einen Ausschnitt aus einer solchen Färbung.



**Abbildung 54: Subzelluläre Lokalisation von NF-YA in primären Neuronen.** A) Immunfärbung von primären Neuronen nach 5-stündiger DMSO-Behandlung. Grün = NF-YA, blau = Zellkerne B) Immunfärbung von primären Neuronen nach 5-stündiger Temsirolimus-Behandlung. Grün = NF-YA, blau = Zellkerne

Wie anhand der Immunfärbung in Abbildung 54 zu erkennen ist, gibt es keine Veränderung der subzellulären Lokalisation von NF-YA nach Temsirolimus-Behandlung. Sowohl nach Behandlung mit DMSO als auch mit Temsirolimus liegt NF-YA hauptsächlich im Zellkern der Zellen vor.

Der nächste Schritt galt der Untersuchung einer Veränderung der potenziellen Bindung von NF-Y und Kandidatengen. Daher wurden primäre Neuronen für 5 Stunden mit DMSO beziehungsweise Temsirolimus behandelt und anschließend die Bindung von NF-YA mit Hilfe von ChIP-qPCR und NF-YA-Antikörpern untersucht. Untersucht wurden zum einen eine Positivkontrolle (Aurka) als auch eine Negativkontrolle (MyoD1) für die Bindung von NF-YA und zum anderen Gene, die nach mTOR-Inhibition herunterreguliert vorlagen und an der Cholesterin-Biosynthese beteiligt sind (Mvd, Nsdhl und Dhcr7). Die Ergebnisse der DNA-Expression der unterschiedlichen Zielgene nach der Chromatin-Immunpräzipitation sind in folgender Abbildung 55 gezeigt.



**Abbildung 55: ChIP-qPCR Analyse der Bindung von NF-YA mit unterschiedlichen Genen nach mTOR-Inhibition.** A) ChIP-qPCR der Positivkontrolle Aurka und der Negativkontrolle MyoD1 nach 5-stündiger Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus. B) ChIP-qPCR der Cholesterin-Biosynthese-Gene Mvd, Nsdhl und Dhcr7 nach 5-stündiger Behandlung mit DMSO oder Temsirolimus. Zur statistischen Auswertung wurden drei biologische Replikate verwendet. Für statistische Analysen wurde der t-Test verwendet. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

Anhand der Abbildung 55 A ist zu sehen, dass die Kontrollen funktioniert haben. Aurka weist eine höhere Bindung von NF-YA auf als MyoD1. Außerdem ist nach der Behandlung mit Temsirolimus die Bindung von NF-YA an den Promotor von Aurka deutlich höher als nach Behandlung mit DMSO. Ähnliches ist in Abbildung 55 B zu

beobachten. Mvd und Nsdhl zeigen nach der Inhibition von mTOR eine signifikante Erhöhung der Bindung an, während Dhcr7 eine Tendenz (p-Wert 0,13) zur erhöhten Bindung anzeigt. Da NF-Y hauptsächlich als Transkriptionsaktivator wirkt, wurde eine Abnahme der NF-YA-Bindung zu seinen Zielstellen innerhalb der Promotoren derjenigen Gene erwartet, welche nach mTOR-Inhibition reduziert vorliegen. Überraschenderweise wurde das Gegenteil beobachtet. NF-YA zeigte sowohl eine erhöhte Bindung an den Promotor des bekannten Ziels Aurka als auch an die Promotoren der Zielgene Mvd und Nsdhl.

## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Identifizierung neuer Gene, welche durch mTOR reguliert werden und deren Dysregulation an der Progression neuronaler Erkrankungen beteiligt sein könnte. Bei mTOR handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche als Hauptregulator der Proteintranslation und des Zellwachstums fungiert. Eine Funktionsstörung des mTOR-Signalwegs gilt als eine der Hauptursachen verschiedener neurologischer Entwicklungsstörungen wie Autismus-Spektrum-Störung (ASD), geistige Behinderung (ID) und Epilepsie. Anhand eines Kandidatenansatzes wurde das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin als eines der Zielgene von mTOR untersucht. Hier wurden Expressionsmuster dieses Gens in primären, corticalen Mausneuronen nach der Inhibition von mTOR mittels Temsirolimus ermittelt und im Anschluss der zugrunde liegende Mechanismus dieser Regulation näher beleuchtet. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Einfluss des mTOR-Signalwegs auf das Transkriptom der corticalen Neuronen untersucht. Hierbei wurde eine erhöhte Expression für einige *immediate early genes* (IEGs) sowie eine verminderte Expression für Gene verschiedener Stoffwechselwege, insbesondere für Gene der Cholesterinbiosynthese, gefunden. Nach Verifizierung der Ergebnisse konnte eine verminderte Cholesterinsynthese *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden.

### 4.1 mTOR-abhängige Regulation von N-Cadherin

Um einen möglichen Einfluss von mTOR auf die Expression von N-Cadherin zu untersuchen, wurden primäre corticale Neurone mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus behandelt. Studien wiesen bereits auf eine Rolle von mTOR auf die Expression von N-Cadherin hin. So konnte in unterschiedlichen Zelllinien nach einer Behandlung mit Rapamycin sowohl eine erhöhte (Liang et al., 2014) als auch eine reduzierte Expression von N-Cadherin (Wie et al., 2017) beobachtet werden. Diese Ergebnisse stützen die These einer besonderen Wichtigkeit der Feinregulation von N-Cadherin während der Embryonalentwicklung (Rago et al., 2014). Die angesprochene Bedeutung von N-Cadherin während der fortschreitenden Entwicklung des Embryos konnten bereits verschiedene Studien bereits nachweisen. So zeigten Studien, dass N-Cadherin unter anderem an der Zellmigration, der Formierung von Schaltkreisen und der Bildung von Synapsen beteiligt ist (Benson & Tanaka, 1998; Jüngling et al., 2006; Stan et al., 2010; Zhang et al., 2010; Rouso et al., 2012). Dass N-Cadherin für die Embryonalentwicklung

essenziell ist, bestätigt sich auch in N-Cadherin Knockout-Mäusen, die im Stadium E10 versterben (Radice et al., 1997). Da N-Cadherin vor allem im Gehirn eine essenzielle Rolle während der Embryonalentwicklung einnimmt (Kadowaki et al., 2007), wurden für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit primäre corticale Neurone der Maus als Zellmodell verwendet. Zur Überprüfung der mTOR-vermittelten Regulation der N-Cadherin Expression wurden diese Neurone kultiviert und mit Temsirolimus behandelt.

Da es sich bei mTOR um einen der Hauptregulatoren der Proteinsynthese handelt, wurde eine verminderte Proteinexpression von N-Cadherin vermutet und bestätigt. Aufgrund der aufkommenden Anzahl an Studien, die eine Rolle von mTOR bei der Regulation der Transkription aufzeigen (Düvel et al., 2010; X. Wang & Proud, 2011), wurde zudem eine verminderte RNA-Expression von N-Cadherin vermutet und ermittelt. Um den Mechanismus der mTOR-abhängigen Reduzierung von N-Cadherin zu ergründen, wurden Luciferase-Assays, 3'RACE- sowie Protein- und RNA-Stabilitätsexperimente durchgeführt. Da Studien existieren, die eine Rolle von mTOR in die Protein- respektive RNA-Stabilität nahelegen (Lisi et al., 2011; Park et al., 2014), wurde ein Einfluss von mTOR auf die Stabilität des Transskripts beziehungsweise des Proteins von N-Cadherin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA von N-Cadherin eine schnellere Reduktion nach der Inhibition von mTOR erfuhr, was einen Einfluss auf die RNA-Stabilität von N-Cadherin aufzeigt. Darüber hinaus ist bekannt, dass der mTOR-Signalweg die Genexpression posttranskriptionell reguliert (Boudra et al., 2016). Deshalb wurde eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der Expression von N-Cadherin über die 3' untranslatierte Region (3'UTR) untersucht. Das Transkript von N-Cadherin enthält eine hochkonservierte 3'UTR mit drei alternativen Polyadenylierungssignalen, deren unterschiedliche Verwendung entweder eine kurze oder eine lange 3'UTR erzeugt. Anhand von Luciferase Assays wurde eine reduzierte Luciferaseaktivität nach der Behandlung mit Temsirolimus nur für den langen 3'UTR festgestellt. Hierbei wurde für den gleichen 3'UTR, bei dem ein Polyadenylierungssignal mutiert wurde, keine signifikante Reduzierung der Luciferaseaktivität beobachtet. Zusammen mit bereits veröffentlichten Studien, die eine Rolle für mTOR in der alternativen Polyadenylierung aufzeigen (Chang et al., 2018), legen diese Ergebnisse nahe, dass mTOR die alternative Polyadenylierung des Transkripts von N-Cadherin reguliert. Polyadenylierung und alternative Polyadenylierung erweisen sich als wichtige Regulatoren der Genexpression, wobei Veränderungen dieser Polyadenylierung Auswirkungen auf viele Krankheiten haben (Gruber & Zavolan, 2019). Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass eine

veränderte Aktivität von mTOR die Länge des 3'UTRs verschiedener Zielgene modulieren kann (Chang et al., 2015; Matoulkova et al., 2017). Daher wurde als nächstes eine mögliche Verkürzung des 3'UTRs von N-Cadherin, aufgrund einer Inhibition von mTOR, untersucht. Anhand von 3'RACE-Experimenten konnte eine verringerte Expression des langen 3'UTRs von N-Cadherin nach Behandlung mit Temsirolimus festgestellt werden. Es kommt demnach zu einer Verschiebung zur vermehrten Expression des kurzen 3'UTR im Verhältnis zum langen 3'UTR nach der Inhibition von mTOR. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass mTOR die Expression von N-Cadherin dahingehend beeinflusst, indem mTOR die alternative Polyadenylierung der mRNA von N-Cadherin verändert. Eine verminderte mTOR-Aktivität verursacht hier eine verminderte Produktion an Transkripten, welche den langen 3'UTR enthalten. Ob die Gabe von Temsirolimus eine Verkürzung des 3'UTRs von N-Cadherin hervorruft, kann nicht abschließend geklärt werden. Weitere Schritte zur Klärung, inwieweit mTOR den 3'UTR von N-Cadherin reguliert, sind demnach von Nöten. Ein möglicher Punkt wären RNA-bindende Proteine, welche durch eine Inhibition von mTOR fehlreguliert sein könnten, was wiederum mit einer Veränderung des 3'UTRs von N-Cadherin einherginge. RNA-bindende Proteine nehmen eine Vielfalt an Funktionen an. So können sie bei dem alternativen Spleißen und der Polyadenylierung beteiligt sein, den Transport der reifen mRNA ins Zytoplasma vermitteln und die Stabilität sowie die Translation verschiedener Zieltranskripte unterstützen (Matoulkova et al., 2012). Eine potenzielle Gruppe an RNA-bindenden Proteinen wären die Hu-Proteinfamilie. Arbeiten von Sosanya und Kollegen konnte bereits eine antagonistische Beziehung zwischen mTOR und HuD bei der Regulierung der Expression des spannungsgesteuerten Kaliumkanals 1.1 (Kv1.1)- andeuten (Sosanya et al., 2013). Zur Hu-Proteinfamilie gehören die hauptsächlich neuronal exprimierte RNA-bindenden Proteine HuB, HuC und HuD sowie das universell exprimierte HuR. Diese Proteine erkennen und binden an die AU-reichen Elemente (ARE) in 3'UTR seiner Ziel-mRNA und verbessern die mRNA-Stabilität und Translation, indem die Proteine um die AREs gegen mRNA destabilisierende Modulatoren konkurrieren (Mukherjee et al., 2011). Zudem spielen diese Proteine eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung und der Langzeitpotenzierung (Akamatsu et al., 1999, 2005). Zusätzlich handelt es sich beispielsweise bei HuR um einen wesentlichen Regulator der mRNA-Translation und der neocorticalen Entwicklung (Popovitchenko et al., 2016). Direkte mRNA-Ziele von HuR oder den anderen Vertretern der Proteinfamilie sind aber weitestgehend unbekannt.

Weitere experimentelle Schritte wären notwendig, um herauszufinden, ob N-Cadherin eines dieser Ziele sein könnte. Neben der Rolle der Hu-Proteinfamilie in der Verbesserung der Stabilität und Translation verschiedener mRNAs, konnte eine Funktion für die Auswahl der PolyA-Stelle während der neuronalen Differenzierung für HuC gezeigt werden (Grassi et al., 2019). Zusätzlich konnte bereits eine Korrelation in Form einer Co-Lokalisierung von HuD und dem Poly-A-bindenden Protein (PABP) nachgewiesen werden (Tiruchinapalli et al., 2008). So könnte durch eine mTOR-Inhibition verursachte Fehlregulation einzelner Hu-Proteine die Stabilität des Transkripts von N-Cadherin beziehungsweise dessen alternative Polyadenylierung beeinträchtigt sein. Darüber hinaus könnten fehlende Bindestellen für miRNAs durch die Verschiebung hin zum kürzeren 3'UTR für eine Veränderung in der Expression der RNA von N-Cadherin verantwortlich sein. MiRNAs binden den 3'UTR des jeweiligen Zieltranskripts und verhindern durch Blockierung der Translation oder Abbau des Transkripts die Proteinbiosynthese des entsprechenden Gens (Nilsen, 2007). Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass miRNAs die Fähigkeit besitzen, die Genexpression direkt oder indirekt zu aktivieren (Ghosh et al., 2008; Tili et al., 2008). Fehlende Bindestellen für miRNAs durch eine mögliche Verkürzung des 3'UTRs von N-Cadherin könnte so eine destabilisierende Wirkung auf dessen Transkript ausüben. Ob eine Fehlregulation von miRNAs oder RNA-bindenden Proteinen durch die Inhibition von mTOR vorliegt, welche den 3'UTR verändert und wodurch schließlich die Expression der mRNA von N-Cadherin reduziert wird, konnte nicht abschließend geklärt werden. Hier könnte man den 3'UTR von N-Cadherin gezielt nach Bindestellen für RNA-bindende Proteine oder miRNAs und dessen Expression nach einer Inhibition von mTOR untersuchen.

## 4.2 Änderungen des Transkriptoms nach mTOR Inhibition

In der vorliegenden Arbeit wurden Änderungen im neuronalen Transkriptom nach mTOR-Inhibition untersucht. Bereits nach einer fünfstündigen Inhibition von mTOR ergab sich eine signifikante Änderung des Transkriptoms in primären Neuronen. So zeigten sich nach dieser Zeit 587 differenziell exprimierte Gene, während nach einer Inhibition von 24 Stunden bereits 1331 Gene differenziell exprimiert vorlagen. Durch die Tatsache, dass die hoch- beziehungsweise herunterregulierten Gene eine ähnliche Anzahl aufwiesen, konnte eine Art Off-Target-Effekt und eine generelle Toxizität durch Temsirolimus ausgeschlossen werden. Eine einseitige Veränderung des Transkriptoms, wodurch die Mehrheit der Gene beispielsweise herunterreguliert vorliegen, könnte in

einem durch Temsirolimus hervorgerufenen schädlichen Effekt begründet liegen. Anhand von Gene Ontology-Analysen konnte gezeigt werden, dass die hochregulierten Gene vor allem in die Regulation der Transkription und in Entwicklungsprozesse involviert sind. Unter den hochregulierten Genen waren insbesondere die IEGs, die vor allem als Transkriptionsfaktoren oder Effektorproteine dienen. Im Gegensatz dazu wurden bei dieser Analyse für die herunterregulierten Gene eine Anreicherung für verschiedene metabolische Prozesse wie Sterol- und Lipid-Biosynthese gefunden. Es waren hierbei vor allem Gene betroffen, die bei der Cholesterinbiosynthese oder dem Transport von Cholesterin beteiligt sind.

#### **4.2.1 Verstärkte Expression von IEGs nach der Inhibition von mTOR**

Nach mTOR-Inhibition erhöhte sich die Expression zahlreicher IEGs, wie beispielsweise *Fosb* und *Egr4*. IEGs zeigen für gewöhnlich ohne Stimulation eine niedrige Expression und werden durch eine Stimulation mit beispielsweise Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder neuronaler Aktivierung schnell, innerhalb von 15 Minuten und transient exprimiert (Sheng und Greenberg, 1990). Im Gegensatz hierzu erfolgte der Expressionsanstieg der IEGs nach mTOR-Inhibition zeitverzögert. Hierbei änderte sich die RNA-Expression von *Fosb* und *Egr4* innerhalb von zwei Stunden nur unwesentlich, während nach vier Stunden ein massiver Anstieg zu verzeichnen war. Es handelt sich in diesem Fall also um einen eher untypischen, nämlich verzögerten, Verlauf. Darüber hinaus ergab sich ein tendenziell noch stärkerer Anstieg der Expression nach einer 24-stündigen Behandlung mit Temsirolimus im Vergleich zum Ausgangsniveau. Zusammenfassend kommt es also sowohl zu einem für IEGs eher späten Anstieg der Expression, als auch zu einer länger anhaltenden Aufrechterhaltung der erhöhten Expression. Da ein derartiges Expressionsmuster von IEGs nicht bekannt war, galt es, die mechanistische Basis der beobachteten Expressionsänderungen zu ergründen. Mehrere Studien zeigten, dass eine Hemmung des mTOR-Signalwegs zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt, was eine mTOR-MAPK-Rückkopplungsschleife darstellt (Carracedo et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu einer Hochregulation verschiedener IEGs wie beispielsweise *cFos*, *Junb* (Murphy et al., 2006) und *Egr4* (Rivera et al., 2011) führt. Darüber hinaus konnte eine Inhibierung des MAPK-Signalwegs eine dramatische Abschwächung der Induktion von IEGs hervorrufen (Tyssowski et al., 2018). Eine durch Temsirolimus hervorgerufene Inhibition von mTOR könnte demnach den MAPK-Signalweg aktivieren, der wiederum

die Expression verschiedener IEGs induziert. Diese Rückkopplungsschleife könnte für den verzögerten Anstieg der Expression der IEGs verantwortlich sein. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs innerhalb von drei Stunden nach einer Temsirolimus-Behandlung gezeigt werden. Eine verzögerte Induktion der IEGs könnte also in der Aktivierung des MAPK-Signalwegs begründet liegen.

Eine gleichzeitige Inhibition von mTOR und des MAP-Kinase-Signalwegs resultierte zwar in einer deutlich geringeren Expressionserhöhung von *cFos* gegenüber einer alleinigen Inhibition von mTOR. Dennoch ist eine erhöhte Expression nach der doppelten Inhibition zu sehen, was darauf hindeutet, dass der MAP-Kinase-Signalweg nicht alleinig für die erhöhte Expression der IEGs nach Temsirolimus-Behandlung verantwortlich ist. Weitere Ansätze wären für eine Abklärung der Rolle des MAPK-Signalwegs von Nöten. Es ist nicht eindeutig geklärt, ob MAPK weitere IEGs reguliert. Bisher konnte lediglich gezeigt werden, dass der MAPK-Signalweg die Expression von IEGs wie *cFos* und *Junb* induziert, sowie die Phosphorylierung von beispielsweise *Npas4* reguliert (Funahashi et al., 2019). Ähnliche Effekte könnten auch für weitere IEGs existieren. Ob der MAPK-Signalweg für die Induktion weiterer IEGs verantwortlich ist, müsste durch weitere Experimente abgeklärt werden. Hier könnte die Expression verschiedener IEGs nach der Gabe von Ceramiden, welche einen Aktivator des MAPK-Signalwegs darstellen (C. L. Chen et al., 2008), überprüft werden. Da nach einer Inhibition stets eine Restaktivität messbar ist, wäre ein besserer Ansatz zur Ausschaltung des MAPK-Signalwegs hilfreich, um die endgültige Rolle dieses Signalwegs aufzudecken. So könnte ein Knockout von MAPK einen stärkeren Effekt auf die Aktivität und die Rolle der Expressionsinduktion von IEGs ausüben.

Darüber hinaus ist bekannt, dass das Absinken der Expression von IEGs auf ihr Normalniveau durch miRNAs reguliert wird. Eine verlängerte Aufrechterhaltung des hohen Expressionsniveaus der IEGs könnte in einer fehlerhaften Expression und dadurch einer fehlenden Inhibition respektive fehlenden Abbaus durch miRNAs durch die Inhibition des mTOR-Signalwegs begründet sein (Aitken et al., 2015). Im Normalfall wird die Produktion von miRNAs nach einer Stimulation der IEGs blockiert, was innerhalb kurzer Zeit aber aufgehoben wird (Aitken et al., 2015). So könnte die Inhibition von mTOR ein fehlerhaftes Expressionsmuster verschiedener miRNAs hervorrufen, wodurch diese miRNAs nicht mehr den 3'UTR der IEGs binden, wodurch diese folglich nicht abgebaut werden könnten. Eine Analyse des Expressionsmusters verschiedener

miRNAs nach der Inhibition von mTOR könnte einen ersten Hinweis auf die Grundlage einer verlängerten Aufrechterhaltung der Expression verschiedener IEGs darstellen.

#### **4.2.2 Expressionsmuster nach mTOR-Inhibition ähnlich einer neuronalen Aktivität**

Es wird angenommen, dass das Aktivitätsmuster eines Neurons in seinem Genexpressionsprofil kodiert ist. Das bedeutet, dass eine neuronale Aktivität ein bestimmtes Genexpressionsmuster vorweist. Hierbei handelt es sich in erster Linie um IEGs, welche wiederum *secondary response genes* regulieren (Winkles, 1997). Diese IEGs sind demnach ein Indikator für neuronale Aktivität.

Nach dem Vergleich unserer Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten (Flavell et al., 2008), konnte eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Genen gefunden werden, die nach der Inhibition von mTOR hochreguliert vorlagen, und den Genen, die nach neuronaler Stimulation vermehrt exprimiert werden. Flavell und Kollegen untersuchten den synaptischen Transkriptionsfaktor *Mef2*, welcher aktivitätsregulierte Gene in der Synapse reguliert. Unter den überlappenden Datensätzen konnten wichtige Transkriptionsfaktoren wie *cFos*, *Egr1* und *Klf4* sowie synaptische Proteine wie *Arc*, *Bdnf* und *Homer1* identifiziert werden. Die Inhibition von mTOR zeigt demnach ein Expressionsmuster, welches dem einer neuronalen Aktivierung ähnelt. Um zu überprüfen, ob die Expression der IEGs von neuronaler Aktivität abhängt, wurden die Neuronen zusätzlich zu der Inhibition von mTOR mit Tetrodotoxin (TTX) behandelt. Es handelt sich dabei um ein Nervengift, welches spannungsaktivierte Natriumkanäle blockiert, wodurch keine Aktionspotenziale ausgelöst werden können und in der Folge die Nervenerregung unterbunden wird. Hierbei zeigte sich ein deutlich reduzierter Anstieg der Expression der beiden IEGs nach zusätzlicher Blockierung der Nervenerregung. Es könnte also sein, dass die mTOR-Inhibition neuronale Aktivität auslöst, was wiederum die erhöhte Expression der IEGs bewirkt. Ob die mTOR-Inhibition neurale Aktivität auslöst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sollte aber im Fokus zukünftiger Experimente stehen. Eine Möglichkeit, dies zu untersuchen, wäre die Patch-Clamp-Technik, bei der es sich um eine elektrophysiologische Technik zur Untersuchung von Ionenströmen einzelner Zellen handelt. Bei dieser Technik wird eine Elektrode direkt auf die Zellmembran gelegt. Die sehr kleine Öffnung der Pipette ermöglicht den Nachweis eines einzelnen Ionenkanalproteins. Gleichzeitig wird eine elektrisch dichte Verbindung zwischen der Messelektrode und der Zellmembran

hergestellt. So können sehr kleine Ströme bzw. Stromveränderungen gemessen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Mikroelektrodenarray-Technik. Diese sogenannten MEAs enthalten Mikroelektroden, die neuronale Signale empfangen oder abgeben können. Wenn Neuronen angeregt werden, fließen Ionenströme durch ihre Membran, wodurch Ladungspotenziale innerhalb und außerhalb der Zelle verändert werden. Die Elektroden des MEA wandeln bei der Aufzeichnung die Potenzialänderung, welche durch den Ionenfluss hervorgerufen wird, in einen Stromfluss um. Beide Methoden könnten dabei Spannungsänderungen und damit Änderungen der neuronalen Aktivität messen.

### **4.2.3 Keine Bestätigung der erhöhten IEG-Expression *in vivo***

Die Ergebnisse, die *in vitro* in primären Neuronen erzielt wurden, konnten *in vivo* nicht bestätigt werden. Hierfür wurden Mäuse intraperitoneal mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin injiziert. Zum einen wurden verschiedene pränatale Stadien untersucht, wofür das tragende Muttertier injiziert wurde, während zum anderen postnatale Tiere direkt intraperitoneal injiziert wurden. Die Entscheidung fiel in diesem Teil der Experimente auf Rapamycin, da derartige Injektionen bereits etabliert waren (Tsai et al., 2013), während Injektionen von Temsirolimus bis dato nicht publiziert waren. Temsirolimus weist zwar ein günstigeres pharmakokinetisches Profil auf, besitzt aber als Prodrug von Rapamycin die gleichen Eigenschaften hinsichtlich Wirkweise und Bindestellen für mTORC1 und FKBP12. In keinem unserer Experimente konnte eine signifikante Expressionsveränderung für die untersuchten IEGs gefunden werden. Weder nach prä- noch postnataler Injektion konnte die *in vitro* nachgewiesene erhöhte Expression auf RNA- beziehungsweise Proteinebene bestätigt werden. Einerseits könnte eine fehlende Expressionserhöhung *in vivo* in einem Zellkulturartefakt begründet liegen, wonach dieses Phänomen nur *in vitro* auftritt. So konnte in einer Studie in retinalen Pigmentepithelzellen gezeigt werden, dass eine Änderung des Mediums bereits zu einer signifikanten Induktion der Transkription einiger IEGs führt (Yang et al., 2006). Ob es bei der Studie ebenfalls zu einer erhöhten Proteinexpression der IEGs kommt, wurde nicht gezeigt. Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit erhöhte Expression auf Proteinebene *in vitro* tendenziell eher gegen einen Zellkulturartefakt spricht, kann dieser Effekt aber dennoch nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin könnte das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Hirnregionen von Bedeutung sein. Die Ergebnisse *in vitro* zeigen lediglich das Geschehen für die Neurone als Einheit, während im lebenden Organismus

aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels der verschiedenen molekularen und subzellulären Ebenen und der Abstimmung der verschiedenen Hirnareale mit den Neuronen andere Mechanismen ermöglicht werden. So existieren im lebenden Individuum deutlich mehr Mechanismen, welche eine Veränderung auf Zellebene neutralisieren respektive ausgleichen können. Dadurch könnten Änderungen auf Ebene der einzelnen Neurone durch höhere Ebenen ausgeglichen werden, was *in vitro* nicht möglich ist. Zudem können auch nur einzelne Neuronensubpopulationen von einer Expressionssteigerung der IEGs betroffen sein. Ein detaillierteres Vorgehen mit Untersuchungen verschiedener Hirnregionen respektive verschiedener Subpopulationen von Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten könnte die Frage nach einer erhöhten IEG-Expression abschließend klären.

#### **4.2.4 mTOR reguliert spezifische bioenergetische zelluläre Prozesse**

Wie bereits angedeutet sind bei der Analyse für die herunterregulierten Gene nach einer Inhibition von mTOR eine Anreicherung von Genen vor allem für metabolische Prozesse gefunden worden. Hierbei waren besonders Gene betroffen, die bei dem Transport von Cholesterin und vor allem der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind.

Eine Beteiligung von mTOR an der Regulation der Expression von Metabolismusgenen war bereits aus der Literatur bekannt (Düvel et al., 2010). Düvel und Kollegen hatten embryonale Mausfibroblasten (MEFs) unter anderem aus *Tsc2*-Knockout-Mäusen verwendet, um die mTOR-vermittelte Regulation der Transkription zu untersuchen. Mutationen im *TSC2*-Gen führen zu der multisystemischen autosomal dominanten genetischen Erkrankung Tuberöse Sklerose (TSC). *TSC2* inaktiviert zusammen mit *TSC1* die GTPase *RHEB*, welche *mTORC1* direkt bindet und aktiviert (Sancak et al., 2007). Eine Mutation in *TSC2* verhindert eine Inaktivierung von *RHEB*, wodurch es zu einer Hyperaktivität des mTOR-Signalwegs kommt. In diesem Zusammenhang wurden die hochregulierten Gene dieser *Tsc2*-defizienten MEFs mit Daten dieser Arbeit verglichen. Es wurde gezielt nach Überschneidungen der Gene gesucht, welche in dieser Arbeit nach der Inhibition von mTOR herunterreguliert vorlagen und denen, die in der Arbeit von Düvel und Kollegen nach einer Hyperaktivität von mTOR hochreguliert waren. Von den insgesamt 233 Genen, welche nach einer 5-stündigen Behandlung mit Temsirolimus vermindert exprimiert werden, ergab sich eine Übereinstimmung von 51 Genen mit denjenigen, die nach einer Mutation von *Tsc2* eine erhöhte Expression aufwiesen. So ergab sich eine Überschneidung von ca. einem Viertel der von uns gefundenen reduziert

exprimierten Gene. Ein großer Unterschied der beiden Studien ist die Auswahl der Zellen, so handelt es sich bei Fibroblasten und Neurone um unterschiedliche Zelltypen, welche ihr eigenes individuelles Expressionsmuster aufweisen. Zunächst galt es, Überschneidungen und auch Unterschiede der beiden Datensätze zu beleuchten. Da vor allem Gene von Stoffwechselwegen in beiden Datensätzen gefunden wurden, galten die ersten Versuche der Analyse von Expressionsmuster der Glykolyse und des Cholesterinstoffwechsels. Für Gene beider Stoffwechselwege zeigte sich eine erhöhte Expression in der Arbeit von Düvel und Kollegen. Zudem konnten weitere Studien belegen, dass eine fehlerhafte Aktivität von mTOR die Aktivität dieser Stoffwechselwege beeinflusst (Cairns et al., 2011; B. T. Wang et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Neuronen essenzielle Gene des Cholesterinstoffwechsels nach mTOR-Inhibition via Temsirolimus signifikant reduziert vorlagen, während Gene der Glykolyse keine Veränderung in ihrer Expression aufzeigten. Nach Behandlung der Neurone mit dem mTOR-Inhibitor Torin1 war jedoch auch die Expression der Glykolyse-Gene reduziert. Genauso wie Rapamycin hemmt Temsirolimus nicht die katalytische Aktivität von mTOR, wodurch nur manche Funktionen von mTOR inhibiert werden. So konnte für die beiden Wirkstoffe zwar eine Wirkung auf die Aktivität der p70S6 Kinase 1 (S6K1), aber nur ein begrenzter Effekt auf das eIF4E Binding Protein (4E-BP) nachgewiesen werden (Choo et al., 2008). Zudem konnte für Temsirolimus keine Wirkung auf mTORC2 gezeigt werden (Rini, 2008). Im Gegensatz hierzu wirkt eine Mutation von TSC2 sowohl auf mTORC1 als auch auf mTORC2 sowie auf die Gesamtheit aller nachfolgenden Substrate des mTOR-Signalwegs (Huang et al., 2008). Bei Torin1 handelt es sich um einen mTOR-Inhibitor der zweiten Generation, der als ATP-kompetitiver Wirkstoff für mTOR fungiert. Diese Generation von Inhibitoren besetzt die katalytische Einheit im C-terminalen Bereich des TOR-Proteins, wodurch sowohl mTORC1 als auch mTORC2 inaktiviert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Torin1 im Gegensatz zu Temsirolimus die Phosphorylierung von 4E-BP in Neuronen verhindert. Ob der Einfluss von Torin1 auf die Gene der Glykolyse durch die fehlende Phosphorylierung oder eine mögliche zusätzliche Inaktivierung von mTORC2 begründet ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Um einen Einfluss von mTORC2 zu erörtern, könnte man mTORC2 gezielt genetisch ausschalten oder einen Ansatz mit antisense Oligonukleotiden verwenden, welche Rictor ansteuern und somit die mTORC2-Aktivität inhibieren (Chen et al., 2019). Durch die fehlenden selektiven Inhibitoren für mTORC2, wäre Methylglyoxal eine Möglichkeit, mTORC2 gezielt zu aktivieren, um

damit einen Effekt auf die Gene der Glykolyse zu untersuchen (Nomura & Inoue, 2015). Um einen Einfluss auf die Gene der Glykolyse durch mTORC1 zu verifizieren, könnte man für diesen Fall *4E-BP* gezielt genetisch verändern. Eine Deletion oder Inhibierung von *4E-BP* könnte eine Behandlung von Torin1 simulieren, ohne die Aktivität von mTORC2 zu beeinflussen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass in mTOR-hyperaktiven MEFs der Transkriptionsfaktor *HIF-1 $\alpha$*  sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erhöht exprimiert vorliegt, dessen Funktion bekannt dafür ist, einen aktivierenden Einfluss auf Gene der Glykolyse auszuüben (Düvel et al., 2010). Eine Veränderung der Expression von *HIF-1 $\alpha$*  nach Torin1 könnte Aufschluss über die Rolle bzw. die Art der Regulation des mTOR-Signalwegs in der Glykolyse geben.

Um die Rolle des mTOR-Signalwegs bei der Expressionsregulation der Gene des Cholesterinstoffwechsel weiter zu untersuchen, wurde eine erhöhte mTOR-Aktivität mittels IGF-1 induziert. IGF-1 wirkt durch seine Eigenschaft als Wachstumsfaktor aktivierend auf den mTOR-Signalweg (Wullschleger et al., 2006). Die erhöhte Expression von *LDLR* und *DHCR7* nach der Gabe von IGF-1 zeigt, dass die reduzierte Expression dieser Gene nach der Gabe von Temsirolimus, in der reduzierten mTOR-Aktivität begründet liegt.

Da die bisherigen Ergebnisse lediglich *in vitro* produziert wurden, war der nächste Schritt die Überprüfung der Resultate *in vivo*. Nach der Bestätigung der Wirksamkeit durch Rapamycin, konnte nach einer einmaligen Injektion prä- und postnatal lediglich auf RNA-Niveau eine verminderte Expression für Gene des Cholesterinstoffwechsels gezeigt werden. Nach Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen pränatal und nach zweifacher Injektion postnatal konnte jedoch eine Reduktion auf Proteinebene nachgewiesen werden, während sich im Gegensatz dazu die Reduktion auf mRNA-Ebene nicht mehr zeigte. Für die reduzierte Proteinexpression wurde ein verzögerter Effekt durch die Gabe *in vivo* im Vergleich zur Applikation *in vitro* angenommen. Zudem könnte die erhöhte Proteinstabilität für einen fehlenden respektive unzureichenden Effekt nach einer einmaligen Injektion verantwortlich sein. Eine mögliche Ursache für die fehlende Expressionsänderung auf RNA-Ebene könnte in der verminderten Proteinexpression liegen. Mechanismen könnten so als Reaktion auf die verminderte Proteinexpression die mRNA-Produktion gezielt erhöhen. So existieren Aktivatoren, welche die Interaktion zwischen RNA-Polymerasen und bestimmten Promotoren erhöhen und so die Expression des Gens fördern (Blackwood & Kadonaga, 1998). Enhancer können durch diese Aktivatoren gebunden werden, wodurch in der DNA-Helix Schleifen entstehen, sodass

ein Promotor an den Initiationskomplex „transportiert“ wird. Auch eine erhöhte Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren aufgrund einer verminderten Proteinexpression ist denkbar, wodurch gezielt bestimmte Transkripte vermehrt exprimiert werden könnten. Zudem wäre eine Art Autoregulation durch die verschiedenen Proteine denkbar, wodurch das Protein seine eigene Produktion positiv reguliert (Jablonka et al., 1992).

#### **4.2.5 mTOR reguliert die Cholesterinbiosynthese in primären Neuronen**

Die Ergebnisse der mTOR-Inhibition zeigten zusammengefasst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine signifikante Reduktion von Genen, die direkt oder indirekt mit dem Cholesterinstoffwechsel in Beziehung stehen. *Mvd*, *Osc*, *Nsdhl* und *Dhcr7* sind Gene, die direkt in die Cholesterinbiosynthese involviert sind. Es handelt sich um Enzyme, die zu verschiedenen Zeitpunkten in die Biosynthese von Cholesterin eingreifen, indem sie die Produktion von Zwischenprodukten vermitteln. Während *Mvd* zu Beginn des Biosynthesewegs eingreift, setzen *Osc* und *Nsdhl* erst später auf dem Weg zur Produktion von Cholesterin ein. Bei *Dhcr7* handelt es sich um das wichtige letzte Enzym in diesem Stoffwechselweg. Es vermittelt die Bildung von Cholesterin aus 7-Dehydrocholesterol. Insgesamt wurden 15 reduzierte Gene nach einer Inhibition von mTOR gefunden, welche direkt bei der Biosynthese von Cholesterin beteiligt sind. Bei *Ldlr* handelt es sich um einen Membranrezeptor, der den Transport von Cholesterin in die Zelle vermittelt. In Übereinstimmung mit der reduzierten Expression der Gene des Cholesterinbiosynthesewegs konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Cholesteringehalt in primären Neuronen und im zerebralen Cortex nach mTOR-Inhibition reduziert war. Wie bereits erwähnt, befindet sich der Großteil des Cholesterins des menschlichen Körpers im Gehirn und ist dort an wichtigen Aufgaben wie der Bildung von Dendriten und Synapsen sowie der axonalen Wegführung beteiligt (Goritz et al., 2005). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass ein reduzierter Cholesterinwert in Neuronen zu Degeneration von Dendriten und Synapsen führen kann (Linetti et al., 2010, Liu et al. 2010). Vor allem während der Embryonalentwicklung sind derartige neurologische Prozesse von besonderer Bedeutung. Versuche an Mäusen zeigten eine verringerte Gehirngröße und eine perinatal auftretende Letalität nach einer Entfernung von Cholesterin in neuronalen Vorläuferzellen (Saito et al., 2009). Zudem konnten Studien bereits zeigen, dass einmalige Injektionen von tragenden Mäusen die frühe

postnatale Entwicklung beeinträchtigt und es zudem zu langanhaltenden negativen Folgen des sozialen Verhaltens kommt (Tsai et al., 2013). Eine durch mTOR hervorgerufene verursachte Fehlregulation der Biosynthese von Cholesterin könnte so für die Progression neuronaler Erkrankungen mitverantwortlich sein.

#### 4.2.6 Regulation der Cholesterin-Gene durch mTOR

Wie bereits erwähnt weist mTOR eine hohe Vielfältigkeit an Regulationsmechanismen auf. Neben der bekanntesten Rolle hinsichtlich der Translation spielt mTOR auch eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation und bei der Regulation der RNA-Stabilität. Bei der Transkription moduliert mTOR die Transkription von Genen, die von allen drei RNA-Polymerasen transkribiert werden (Mayer & Grummt, 2006). Darüber hinaus werden eine große Anzahl an Transkriptionsfaktoren wie *YY1*, *SREBPs* und *HIF-1 $\alpha$*  direkt durch mTORC1 reguliert (Laplante & Sabatini, 2013). Neue Erkenntnisse deuten außerdem auf eine direkte Rolle von mTOR als Transkriptionsfaktor hin, der direkt mit dem Chromatin im Nucleus interagiert (Giguère, 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mTOR weder die Stabilität der Cholesterinbiosynthese-mRNAs noch die Chromatinakzessibilität der sie kodierenden Gene beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass mTOR die Transkription der Cholesterinbiosynthese-Gene durch die veränderte Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren oder Enhancer dieser Gene reguliert. Eine Überprüfung auf potenzielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotorregionen der herunterregulierten Gene ergab überrepräsentierte Bindestellen für die drei Transkriptionsfaktoren *SPI*, *SREBP* und *NF-Y*. In den Genen, die direkt oder indirekt mit dem Transport oder der Synthese von Cholesterin beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass deren Promotoren entweder Bindestellen für alle drei Transkriptionsfaktoren oder für die beiden Transkriptionsfaktoren *NF-Y* und *SPI* enthielten. Die SREBP-Transkriptionsfaktoren sind für die mTOR-induzierte Expression von metabolischen Genen erforderlich (Peterson et al., 2011). Über den Zusammenhang zwischen der mTOR-Aktivität und der Funktion von NF-Y ist jedoch bedeutend weniger bekannt. Beim NF-Y-Komplex handelt es sich um ein Trimer, das aus NF-YA, NF-YB und NF-YC besteht. Mit Histon-ähnlichen Strukturen bilden NF-YB und NF-YC nach Heterodimerisierung eine Grundlage für die Assoziation von NF-YA. Als Mitglied des NF-Y-Komplexes, vermittelt NF-YA die DNA-Bindungsspezifität für das CCAAT-Motiv in der proximalen Promotorregion (Maity & De Crombrughe, 1998). Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte keine

subzelluläre Änderung der Lokalisation von NF-YA nach der Inhibition von mTOR festgestellt werden. NF-YA war sowohl nach der Behandlung mit DMSO als auch Temsirolimus vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Nach der bioinformatischen Analyse für Bindungsstellen für NF-Y, konnte eine Bindung zu diversen Zielgenen mittels ChIP-qPCR bestätigt werden. Um zu testen, ob sich die NF-Y Bindung nach der Inhibition von mTOR ändert und weil NF-YA für die Steuerung des NF-Y-Komplexes zu seinen Zielsequenzen verantwortlich ist, wurden die ChIP-qPCR Experimente mit NF-YA spezifischen Antikörpern durchgeführt. Da NF-Y hauptsächlich als Transkriptionsaktivator wirkt, wurde eine Abnahme der Bindung von NF-YA zu seinen Zielstellen innerhalb der Promotoren von mTOR-regulierten Genen nach der Inhibition von mTOR erwartet. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Bindung an die Promotoren der mTOR-Zielgene *MVD* und *NSDHL* nach der Behandlung mit Temsirolimus aufgezeigt. NF-Y reguliert eine zunehmende Anzahl von Genen und wird ubiquitär exprimiert. Der Knockout von NF-YA bei Mäusen führt zu einer frühen embryonalen Letalität (Bhattacharya et al., 2003). Während NF-Y bei der Differenzierung häufig herunterreguliert wird, ist es in reifen Neuronen des Gehirns der adulten Maus aktiv. Eine Deletion von NF-Y führt hierbei zu einer neuronalen Degeneration (Gurtner et al., 2003; Yamanaka et al., 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass NF-Y in Zusammenarbeit mit *SREBP1* oder *SREBP2* und *SP1* mit Zielgenpromotoren interagiert und Gene verschiedener Stoffwechselwege aktiviert (Benatti et al., 2016; Reed et al., 2008). Die Tatsache, dass die NF-YA Bindung an den untersuchten Zielgenen nach der Inhibition von mTOR zunahm, legt einen Mechanismus nahe, bei dem NF-YA wichtig sein kann, um andere Transkriptionsfaktoren wie SREBPs zu rekrutieren. Dies legt zudem nahe, dass NF-YA in diesem Zusammenhang eher als Transkriptionsrepressor statt als Aktivator fungiert. Eine Repressoraktivität durch NF-Y konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Cha-Molstad et al., 2012; Nassiri et al., 2010; Peng & Jahroudi, 2002). So konnte beispielsweise durch Cha-Molstad und Kollegen gezeigt werden, dass in Kardiomyozyten, die mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil behandelt wurden, die Expression von *Txnip* durch eine NF-Y-abhängige Transkriptionsrepression reduziert wurde. Übereinstimmend mit dieser Studie, fanden wir eine signifikant reduzierte Expression von *Txnip* in primären Neuronen nach einer 5-stündigen Behandlung mit Temsirolimus. Gegen diese Theorie spricht eine Studie in N2A-Zellen, die nach einem Knockdown von NF-YA und NF-YC eine reduzierte Expression verschiedener Gene, die bei der Cholesterinsynthese beteiligt sind, zeigte (Yamanaka et al., 2020). Welche Rolle

NF-YA bei der Regulation der Gene, welche nach mTOR-Inhibition fehlreguliert sind, einnimmt, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Es wird angenommen, dass eine reduzierte mTOR-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von neurologischen Entwicklungsstörungen wie beispielsweise dem Rett Syndrom spielt (Li et al., 2013). Wie eine verminderte mTOR-Aktivität zur Krankheitsentwicklung bei derartigen Erkrankungen beiträgt, ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Defekte im Cholesterinsyntheseweg könnten ein beitragender Mechanismus sein. Bereits kleine Störungen des Cholesterinstoffwechsels können die neuronale Entwicklung stark beeinflussen (Driver et al., 2016; Waterham, 2006). Niedrige Cholesterinspiegel wurden mit einer Vielzahl von neurologischen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht. Außerdem existieren mehrere Entwicklungssyndrome, die durch Mutationen in Genen des Cholesterin-Biosynthesewegs verursacht werden. Das häufigste mit Defekten der Cholesterinbiosynthese assoziierte genetische Syndrom ist das autosomal rezessiv vererbte Smith-Lemli-Opitz Syndrom, das durch Mutationen im *DHCR7*-Gen verursacht wird. Darüber hinaus führen Mutationen im *NSDHL*-Gen zur X-chromosomal dominanten Störung CHILD-Syndrom (König et al., 2000) und der X-chromosomal rezessiven Störung CK-Syndrom (McLarren et al., 2010), während Mutationen in *MVK* mit der autosomal rezessiven Störung Mevalonazidurie (Schafer et al., 1992) assoziiert sind. Alle drei Syndrome sind durch strukturelle Gehirnanomalien und/oder neurologische Symptome einschließlich geistiger Behinderung gekennzeichnet. Sowohl *NSDHL* als auch *MVD* sind direkt an der Cholesterinbiosynthese beteiligt. Neben diesen beiden Enzymen konnten wir in der vorliegenden Arbeit auch eine reduzierte Expression für *Dhcr7* nach der Inhibition von mTOR beobachten.

Obwohl diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass Störungen der Cholesterinbiosynthese zur Pathogenese von Entwicklungsstörungen, die mit einer Herunterregulierung von mTOR verbunden sind, beitragen könnten, müssen weitere Studien erfolgen. Es ist daher immer noch unklar, ob eine verminderte mTOR-Aktivität zu langanhaltenden Defekten in der Cholesterinbiosynthese und zu einer dauerhaften Verringerung des Cholesterinspiegels führt. In den *in vivo*-Experimenten beobachteten wir, dass 24 Stunden nach Injektion einer Einzeldosis Rapamycin die mRNA-Expression aller getesteten Gene verringert war. Nach drei Tagen Rapamycin-Injektion war die Expression jedoch wieder auf normale Werte zurückgekehrt. Diese Beobachtung weist auf das Vorhandensein von Rückkopplungs- oder Kompensationsmechanismen hin. Tatsächlich beinhaltet die

Cholesterinbiosynthese mehrere Rückkopplungsmechanismen (Ahmad et al., 2019). Buchovecky und Kollegen fanden heraus, dass im Gehirn eines Mausmodells für das Rett-Syndrom (Mecp2-Nullmäuse) das Gesamtcholesterin bei P56 erhöht war, wenn mutierte Männchen schwere Symptome hatten. In einem späteren Alter (P70) waren die Cholesterinspiegel im Gehirn jedoch mit den Wildtypspiegeln vergleichbar. Wahrscheinlich hatte die Überproduktion von Cholesterin zu einer späteren Verringerung der Cholesterinsynthese geführt. Bemerkenswerterweise besserte die genetische oder pharmakologische Hemmung der Cholesterinsynthese einige der Symptome bei diesen Mäusen (Buchovecky et al., 2013).

Unsere Studien beschränkten sich auf die mTOR-vermittelte Regulation der Cholesterinbiosynthese in corticalen Neuronen. Während das Gehirn sein eigenes Cholesterin auch während der Entwicklung synthetisieren muss, wenn sich die Blut-Hirnschranke noch nicht vollständig gebildet hat, ist die neuronale Cholesterinsynthese während eines kritischen Entwicklungszeitfensters am wichtigsten (Fünfschilling et al., 2012). Neuronen im erwachsenen Gehirn sind hauptsächlich auf Astrozyten angewiesen, um Cholesterin bereitzustellen. Darüber hinaus synthetisieren Oligodendrozyten während der Myelinisierung große Mengen an Cholesterin. Im Zebrafisch wurde bereits gezeigt, dass Cholesterin für die mTOR-Aktivität in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen benötigt wird und dass mTOR die cholesterinabhängige Myelin-Genexpression reguliert (Mathews & Appel, 2016). Eine offene Frage ist daher, ob die mTOR-Signalübertragung in Astrozyten und Oligodendrozyten für die Cholesterinbiosynthese ebenso wichtig ist wie in Neuronen.

## Literaturverzeichnis

- Abraham, W. C., Dragunow, M., & Tate, W. P. (1991). The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Molecular Neurobiology*, *5*(2–4), 297–314. <https://doi.org/10.1007/BF02935553>
- Accogli, A., Calabretta, S., St-Onge, J., Boudrahem-Addour, N., Dionne-Laporte, A., Joset, P., Azzarello-Burri, S., Rauch, A., Krier, J., Fieg, E., Pallais, J. C., Acosta, M. T., Adams, D. R., Agrawal, P., Alejandro, M. E., Allard, P., Alvey, J., Andrews, A., Ashley, E. A., ... Srour, M. (2019). De Novo Pathogenic Variants in N-cadherin Cause a Syndromic Neurodevelopmental Disorder with Corpus Collosum, Axon, Cardiac, Ocular, and Genital Defects. *American Journal of Human Genetics*, *105*(4), 854–868. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.09.005>
- Ahmad, F., Sun, Q., Patel, D., & Stommel, J. M. (2019). Cholesterol metabolism: A potential therapeutic target in glioblastoma. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11020146>
- Ai, D., Chen, C., Han, S., Ganda, A., Murphy, A. J., Haeusler, R., Thorp, E., Accili, D., Horton, J. D., & Tall, A. R. (2012). Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1262–1270. <https://doi.org/10.1172/JCI61919>
- Aitken, S., Magi, S., Alhendi, A. M. N., Itoh, M., Kawaji, H., Lassmann, T., Daub, C. O., Arner, E., Carninci, P., Forrest, A. R. R., Hayashizaki, Y., Khachigian, L. M., Okada-Hatakeyama, M., Semple, C. A., Sandelin, A., Wells, C., Hume, D. A., Summers, K. M., Vitting-Seerup, K., ... Yumoto, M. N. (2015). Transcriptional Dynamics Reveal Critical Roles for Non-coding RNAs in the Immediate-Early Response. *PLoS Computational Biology*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004217>
- Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsuhashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y., Okano, H. J., Sakakibara, S. I., Takano, H., Takano, T., Takahashi, T., Noda, T., & Okano, H. (2005). The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(12), 4625–4630. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407523102>
- Akamatsu, W., Okano, H. J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S. I., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R. B., & Okano, H. (1999). Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(17), 9885–9890. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9885>
- Ambrosini, G., Praz, V., Jagannathan, V., & Bucher, P. (2003). Signal search analysis server. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3618–3620. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg611>
- Angevine, J., & Sidman, R. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, *192*, 766–768. <https://doi.org/10.1038/192766b0>
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., & Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, *41*(6), 881–890. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00140-0)
- Antion, M. D., Merhav, M., Hoeffler, C. A., Reis, G., Kozma, S. C., Thomas, G.,

- Schuman, E. M., Rosenblum, K., & Klann, E. (2008). Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learning and Memory*, *15*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1101/lm.661908>
- Bai, X., & Jiang, Y. (2010). Key factors in mTOR regulation. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, Issue 2, pp. 239–253). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0163-7>
- Banerjee, A., Luong, J. A., Ho, A., Saib, A. O., & Ploski, J. E. (2016). Overexpression of Homer1a in the basal and lateral amygdala impairs fear conditioning and induces an autism-like social impairment. *Molecular Autism*, *7*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0077-9>
- Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N., & Klann, E. (2005). The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *25*(42), 9581–9590. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2423-05.2005>
- Benatti, P., Chiaramonte, M. L., Lorenzo, M., Hartley, J. A., Hochhauser, D., Gnesutta, N., Mantovani, R., Imbriano, C., & Dolfini, D. (2016). NF-Y activates genes of metabolic pathways altered in cancer cells. *Oncotarget*, *7*(2), 1633–1650. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6453>
- Benson, D. L., & Tanaka, H. (1998). *N-Cadherin Redistribution during Synaptogenesis in Hippocampal Neurons*.
- Bhattacharya, A., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R., De Crombrughe, B., & Maity, S. N. (2003). The B Subunit of the CCAAT Box Binding Transcription Factor Complex (CBF/NF-Y) Is Essential for Early Mouse Development and Cell Proliferation. *Cancer Research*, *63*(23), 8167–8172.
- Blackwood, E. M., & Kadonaga, J. T. (1998). Going the distance: A current view of enhancer action. In *Science* (Vol. 281, Issue 5373, pp. 60–63). Science. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.60>
- 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. *Molecular Neurobiology*, *54*(4), 2562–2578. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9821-6>
- Boldog, E., Bakken, T. E., Hodge, R. D., Novotny, M., Aevermann, B. D., Baka, J., Bordé, S., Close, J. L., Diez-Fuertes, F., Ding, S. L., Faragó, N., Kocsis, Á. K., Kovács, B., Maltzer, Z., McCorrison, J. M., Miller, J. A., Molnár, G., Oláh, G., Ozsvár, A., ... Tamás, G. (2018). Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nature Neuroscience*, *21*(9), 1185–1195. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0205-2>
- Boudra, R., Lagrèfeuille, R., Lours-Calet, C., de Jousineau, C., Loubeau-Legros, G., Chaveroux, C., Saru, J. P., Baron, S., Morel, L., & Beaudoin, C. (2016). mTOR transcriptionally and post-transcriptionally regulates Npm1 gene expression to contribute to enhanced proliferation in cells with Pten inactivation. *Cell Cycle*, *15*(10), 1352–1362. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1166319>
- Bozdagi, O., Wang, X. Bin, Nikitczuk, J. S., Anderson, T. R., Bloss, E. B., Radice, G. L., Zhou, Q., Benson, D. L., & Huntley, G. W. (2010). Persistence of coordinated long-term potentiation and dendritic spine enlargement at mature hippocampal CA1

- synapses requires N-cadherin. *Journal of Neuroscience*, 30(30), 9984–9989. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1223-10.2010>
- 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, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11041–11048. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11041>
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W., & Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes and Development*, 18(23), 2893–2904. <https://doi.org/10.1101/gad.1256804>
- Buchovecky, C. M., Turley, S. D., Brown, H. M., Kyle, S. M., McDonald, J. G., Liu, B., Pieper, A. A., Huang, W., Katz, D. M., Russell, D. W., Shendure, J., & Justice, M. J. (2013). A suppressor screen in Mecp2 mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nature Genetics*, 45(9), 1013–1020. <https://doi.org/10.1038/ng.2714>
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 2, pp. 85–95). Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Campbell, D. S., & Holt, C. E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 32(6), 1013–1026. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00551-7)
- 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. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3065–3074. <https://doi.org/10.1172/JCI34739>
- Carson, R. P., Kelm, N. D., West, K. L., Does, M. D., Fu, C., Weaver, G., McBrier, E., Parker, B., Grier, M. D., & Ess, K. C. (2015). Hypomyelination following deletion of *Tsc2* in oligodendrocyte precursors. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(12), 1041–1054. <https://doi.org/10.1002/acn3.254>
- Castellano, B. M., Thelen, A. M., Moldavski, O., Feltes, M., Van Der Welle, R. E. N., Mydock-McGrane, L., Jiang, X., Van Eijkeren, R. J., Davis, O. B., Louie, S. M., Perera, R. M., Covey, D. F., Nomura, D. K., Ory, D. S., & Zoncu, R. (2017). Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science*, 355(6331), 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.aag1417>
- Celikel, T. (2007). Select overexpression of homer1a in dorsal hippocampus impairs spatial working memory. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 97–110. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.007.2007>
- Cha-Molstad, H., Xu, G., Chen, J., Jing, G., Young, M. E., Chatham, J. C., & Shalev, A. (2012). Calcium channel blockers act through nuclear factor Y to control transcription of key cardiac genes. *Molecular Pharmacology*, 82(3), 541–549.

<https://doi.org/10.1124/mol.112.078253>

- Chang, J. W., Zhang, W., Yeh, H. S., De Jong, E. P., Jun, S., Kim, K. H., Bae, S. S., Beckman, K., Hwang, T. H., Kim, K. S., Kim, D. H., Griffin, T. J., Kuang, R., & Yong, J. (2015). mRNA 3'-UTR shortening is a molecular signature of mTORC1 activation. *Nature Communications*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms8218>
- Chang, J. W., Zhang, W., Yeh, H. S., Park, M., Yao, C., Shi, Y., Kuang, R., & Yong, J. (2018). An integrative model for alternative polyadenylation, IntMAP, delineates mTOR-modulated endoplasmic reticulum stress response. *Nucleic Acids Research*, *46*(12), 5996–6008. <https://doi.org/10.1093/nar/gky340>
- Chen, C. L., Lin, C. F., Chang, W. T., Huang, W. C., Teng, C. F., & Lin, Y. S. (2008). Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood*, *111*(8), 4365–4374. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-106336>
- Chen, J., Zhu, H., Liu, Q., Ning, D., Zhang, Z., Zhang, L., Mo, J., Du, P., Liu, X., Song, S., Fan, Y., Liang, H., Liu, J., Zhang, B., & Chen, X. (2019). DEPTOR induces a partial epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via autocrine TGF $\beta$ 1 signaling and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *38*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1220-1>
- 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>
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Sang, G. K., Roux, P. P., & Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(45), 17414–17419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809136105>
- 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>
- Courchesne, E., & Pierce, K. (2005). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: Local over-connectivity but long-distance disconnection. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 15, Issue 2, pp. 225–230). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.001>
- Coutellier, L., Beraki, S., Ardestani, P. M., Saw, N. L., & Shamloo, M. (2012). Npas4: A Neuronal Transcription Factor with a Key Role in Social and Cognitive Functions Relevant to Developmental Disorders. *PLoS ONE*, *7*(9), e46604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046604>
- Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., & Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature*, *450*(7170), 736–740. <https://doi.org/10.1038/nature06322>
- Curran, T., & Franza, B. R. (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. In *Cell* (Vol. 55, Issue 3, pp. 395–397). Cell. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90024-4)
- Davis, O. B., Shin, H. R., Lim, C.-Y., Wu, E. Y., Kukurugya, M., Maher, C. F., Perera, R. M., Ordonez, M. P., & Zoncu, R. (2020). NPC1-mTORC1 Signaling Couples

- Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. *Developmental Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.016>
- DeFelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 5, Issue MAY). Front Neuroanat. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00029>
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 12, Issue 2, pp. 105–112). Curr Opin Lipidol. <https://doi.org/10.1097/00041433-200104000-00003>
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 45, Issue 8, pp. 1375–1397). Lipid Research Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>
- Driver, A. M., Kratz, L. E., Kelley, R. I., & Stottmann, R. W. (2016). Altered cholesterol biosynthesis causes precocious neurogenesis in the developing mouse forebrain. *Neurobiology of Disease*, *91*, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.017>
- 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>
- Ehninger, D., Han, S., Shilyansky, C., Zhou, Y., Li, W., Kwiatkowski, D. J., Ramesh, V., & Silva, A. J. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, *14*(8), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>
- Eid, W., Dauner, K., Courtney, K. C., Gagnon, A. M., Parks, R. J., Sorisky, A., & Zha, X. (2017). mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(30), 7999–8004. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705304114>
- Ertan, G., Arulrajah, S., Tekes, A., Jordan, L., & Huisman, T. A. G. M. (2010). Anomalie cérébelleuse chez des enfants et adultes jeunes présentant une sclérose tubéreuse complexe: aspects en IRM cérébrale et imagerie de diffusion. *Journal of Neuroradiology*, *37*(4), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2009.12.006>
- Feng, Z., Hu, W., De Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., Lowe, S., & Levine, A. J. (2007). The regulation of AMPK  $\beta$ 1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research*, *67*(7), 3043–3053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4149>
- Funahashi, Y., Ariza, A., Emi, R., Xu, Y., Shan, W., Suzuki, K., Kozawa, S., Ahammad, R. U., Wu, M., Takano, T., Yura, Y., Kuroda, K., Nagai, T., Amano, M., Yamada, K., & Kaibuchi, K. (2019). Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors. *Cell Reports*, *29*(10), 3235–3252.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.116>
- Fünfschilling, U., Jockusch, W. J., Sivakumar, N., Möbius, W., Corthals, K., Li, S.,

- Quintes, S., Kim, Y., Schaap, I. A. T., Rhee, J. S., Nave, K. A., & Saher, G. (2012). Critical time window of neuronal cholesterol synthesis during neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 32(22), 7632–7645. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1352-11.2012>
- 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- $\delta$  phosphorylation and cell migration downstream of G $\alpha$  12. *Nature Cell Biology*, 14(7), 686–696. <https://doi.org/10.1038/ncb2507>
- Garza-Lombó, C., & Gonsebatt, M. E. (2016). Mammalian target of rapamycin: Its role in early neural development and in adult and aged brain function. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 10, Issue JUN, p. 157). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00157>
- Ghosh, T., Soni, K., Scaria, V., Halimani, M., Bhattacharjee, C., & Pillai, B. (2008). MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acids Research*, 36(19), 6318–6332. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn624>
- Giguère, V. (2018). Canonical signaling and nuclear activity of <scp>mTOR</scp> —a teamwork effort to regulate metabolism and cell growth. *The FEBS Journal*, 285(9), 1572–1588. <https://doi.org/10.1111/febs.14384>
- Gilbert, J., & Man, H. Y. (2016). The X-linked autism protein KIAA2022/KIDLIA regulates neurite outgrowth via N-cadherin and  $\delta$ -catenin signaling. *ENeuro*, 3(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0238-16.2016>
- Gingras, A., Gygi, S., & Raught, B. (1999). *Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism*. *Genes & Development*. <http://genesdev.cshlp.org/content/13/11/1422.short>
- Gkogkas, C. G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D. B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., Major, F., Lasko, P., Ruggero, D., Nader, K., Lacaille, J. C., & Sonenberg, N. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*, 493(7432), 371–377. <https://doi.org/10.1038/nature11628>
- Gleeson, J. G., & Walsh, C. A. (2000). Neuronal migration disorders: From genetic diseases to developmental mechanisms. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 23, Issue 8, pp. 352–359). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01607-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01607-6)
- Goritz, C., Mauch, D. H., & Pfrieder, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(2), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.006>
- Grassi, E., Santoro, R., Umbach, A., Grosso, A., Oliviero, S., Neri, F., Conti, L., Ala, U., Provero, P., Dicunto, F., & Merlo, G. R. (2019). Choice of alternative polyadenylation sites, mediated by the rna-binding protein Elavl3, plays a role in differentiation of inhibitory neuronal progenitors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 518. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00518>
- Gruber, A. J., & Zavolan, M. (2019). Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 20, Issue 10, pp. 599–614). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0145-z>
- Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.

- In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 8, pp. 622–634). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>
- Gurtner, A., Manni, I., Fuschi, P., Mantovani, R., Guadagni, F., Sacchi, A., & Piaggio, G. (2003). Requirement for down-regulation of the CCAAT-binding activity of the NF-Y transcription factor during skeletal muscle differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, *14*(7), 2706–2715. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-09-0600>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Hall, M. N. (2008). mTOR-What Does It Do? *Transplantation Proceedings*, *40*(10 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.009>
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., & Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
- Hawrylycz, M., Miller, J. A., Menon, V., Feng, D., Dolbeare, T., Guillozet-Bongaarts, A. L., Jegga, A. G., Aronow, B. J., Lee, C. K., Bernard, A., Glasser, M. F., Dierker, D. L., Menche, J., Szafer, A., Collman, F., Grange, P., Berman, K. A., Mihalas, S., Yao, Z., ... Lein, E. (2015). Canonical genetic signatures of the adult human brain. *Nature Neuroscience*, *18*(12), 1832–1844. <https://doi.org/10.1038/nn.4171>
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y. C., Laslo, P., Cheng, J. X., Murre, C., Singh, H., & Glass, C. K. (2010). Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Molecular Cell*, *38*(4), 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>
- Hentges, K. E., Sirry, B., Gingeras, A. C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., & Peterson, A. S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(24), 13796–13801. <https://doi.org/10.1073/pnas.241184198>
- Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(32), 12138–12143. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604911103>
- Herschman, H. R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 60, pp. 281–319). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001433>
- Hill, R. S., & Walsh, C. A. (2005). Molecular insights into human brain evolution. In *Nature* (Vol. 437, Issue 7055, pp. 64–67). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature04103>
- Hoeffler, C. A., Sanchez, E., Hagerman, R. J., Mu, Y., Nguyen, D. V., Wong, H., Whelan, A. M., Zukin, R. S., Klann, E., & Tassone, F. (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes, Brain and Behavior*, *11*(3), 332–341. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00768.x>
- Hoeffler, Charles 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>
- 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>
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/jci15593>
- Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M., & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 Complex Is Required for Proper Activation of mTOR Complex 2. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(12), 4104–4115. <https://doi.org/10.1128/mcb.00289-08>
- Jablonka~, E., Lachmann~, M., & Lamb, M. J. (1992). Evidence, Mechanisms and Models for the Inheritance of Acquired Characters. In *J. theor. Biol* (Vol. 158).
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüeegg, 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>
- Jayaraman, R. (1972). Transcription of bacteriophage T4 DNA by Escherichia coli RNA polymerase in vitro: Identification of some immediate-early and delayed-early genes. *Journal of Molecular Biology*, *70*(2), 253–263. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90537-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90537-2)
- 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>
- Jüngling, K., Eulenburg, V., Moore, R., Kemler, R., Lessmann, V., & Gottmann, K. (2006). N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *Journal of Neuroscience*, *26*(26), 6968–6978. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1013-06.2006>
- Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., & Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*, *304*(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.014>
- Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., & Aiba, A. (2014). Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberous Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. *Cell Reports*, *7*(5), 1626–1639. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.048>
- Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K. ichiro, Nakajima, K., Nabeshima, Y. ichi, & Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*, *67*(4), 588–602. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.007>

- Kim, E. Y., Kim, A., Kim, S. K., Kim, H. J., Chang, J., Ahn, C. M., & Chang, Y. S. (2014). Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 $\beta$  signaling-mediated upregulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells. *Respiratory Research*, *15*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-26>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, *13*(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, L. C., Cook, R. S., & Chen, J. (2017). mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. In *Oncogene* (Vol. 36, Issue 16, pp. 2191–2201). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.363>
- Korade, Z., & Kenworthy, A. K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. In *Neuropharmacology* (Vol. 55, Issue 8, pp. 1265–1273). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019>
- Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S. J., & Parada, L. F. (2006). Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Neuron*, *50*(3), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.023>
- König, A., Happle, R., Bornholdt, D., Engel, H., & Grzeschik, K.-H. (2000). Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *90*(4), 339–346. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(20000214\)90:4<339::AID-AJMG15>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(20000214)90:4<339::AID-AJMG15>3.0.CO;2-5)
- La Fata, G., Gärtner, A., Domínguez-Iturza, N., Dresselaers, T., Dawitz, J., Poorthuis, R. B., Aversa, M., Himmelreich, U., Meredith, R. M., Achsel, T., Dotti, C. G., & Bagni, C. (2014). FMRP regulates multipolar to bipolar transition affecting neuronal migration and cortical circuitry. *Nature Neuroscience*, *17*(12), 1693–1700. <https://doi.org/10.1038/nn.3870>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- 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>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science*, *126*(8), 1713–1719. <https://doi.org/10.1242/jcs.125773>
- 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>
- Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A. W., Orlando, D. A., Lovén, J., Kwok, S. M., Feldman, D. A., Bateup, H. S., Gao, Q., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Lewis, C. A., Vander Heiden, M. G., Sur, M., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2013). Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 446–458. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.001>

- Liang, S., Salas, T., Gencaslan, E., Li, B., & Habib, S. L. (2014). Tuberin-deficiency downregulates N-cadherin and upregulates vimentin in kidney tumor of TSC patients. *Oncotarget*, *5*(16), 6936–6946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2206>
- Lin, Y., Bloodgood, B. L., Hauser, J. L., Lapan, A. D., Koon, A. C., Kim, T. K., Hu, L. S., Malik, A. N., & Greenberg, M. E. (2008). Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. *Nature*, *455*(7217), 1198–1204. <https://doi.org/10.1038/nature07319>
- Linetti, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., & Rosa, P. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *Journal of Cell Science*, *123*(4), 595–605. <https://doi.org/10.1242/jcs.060681>
- Lisi, L., Navarra, P., Feinstein, D. L., & Dello Russo, C. (2011). The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-1>
- Liu, J., Ma, K. L., Zhang, Y., Wu, Y., Hu, Z. B., Lv, L. L., Tang, R. N., Liu, H., Ruan, X. Z., & Liu, B. C. (2015). Activation of mTORC1 disrupted LDL receptor pathway: A potential new mechanism for the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *61*, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.011>
- Liu, J. P., Tang, Y., Zhou, S., Toh, B. H., McLean, C., & Li, H. (2010). Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In *Molecular and Cellular Neuroscience* (Vol. 43, Issue 1, pp. 33–42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.07.013>
- Madke, B. (2013). Topical rapamycin (sirolimus) for facial angiofibromas. *Indian Dermatology Online Journal*, *4*(1), 54. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.105488>
- Maity, S. N., & De Crombrughe, B. (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 23, Issue 5, pp. 174–178). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01201-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01201-8)
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., & Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate. *Neuron*, *37*(5), 751–764. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00116-8)
- Mathews, E. S., & Appel, B. (2016). Cholesterol biosynthesis supports myelin gene expression and axon ensheathment through modulation of P13K/Akt/mTor signaling. *Journal of Neuroscience*, *36*(29), 7628–7639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0726-16.2016>
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. In *RNA Biology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 563–576). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/rna.20231>
- Matoulkova, E., Sommerova, L., Pastorek, M., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2017). Regulation of AGR2 expression via 3'UTR shortening. *Experimental Cell Research*, *356*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.04.011>
- Mayer, C., & Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. In *Oncogene* (Vol. 25, Issue 48, pp. 6384–6391). *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209883>

- McLarren, K. W., Severson, T. M., Du Souich, C., Stockton, D. W., Kratz, L. E., Cunningham, D., Henderson, G., Morin, R. D., Wu, D., Paul, J. E., An, J., Nelson, T. N., Chou, A., Debarber, A. E., Merkens, L. S., Michaud, J. L., Waters, P. J., Yin, J., McGillivray, B., ... Boerkoel, C. F. (2010). Hypomorphic temperature-sensitive alleles of NSDHL cause CK syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *87*(6), 905–914. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.004>
- Meikle, L., Talos, D. M., Onda, H., Pollizzi, K., Rotenberg, A., Sahin, M., Jensen, F. E., & Kwiatkowski, D. J. (2007). A mouse model of tuberous sclerosis: Neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival. *Journal of Neuroscience*, *27*(21), 5546–5558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007>
- Mendez, P., De Roo, M., Poglia, L., Klauser, P., & Muller, D. (2010). N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *Journal of Cell Biology*, *189*(3), 589–600. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003007>
- Mikaelian, I., Malek, M., Gadet, R., Viallet, J., Garcia, A., Girard-Gagnepain, A., Hesling, C., Gillet, G., Gonzalo, P., Rimokh, R., & Billaud, M. (2013). Genetic and pharmacologic inhibition of mTORC1 promotes EMT by a TGF- $\beta$ -independent mechanism. *Cancer Research*, *73*(22), 6621–6631. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0560>
- 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*, *8*(JAN2016). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>
- Mukherjee, N., Corcoran, D. L., Nusbaum, J. D., Reid, D. W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Tuschl, T., Ohler, U., & Keene, J. D. (2011). Integrative Regulatory Mapping Indicates that the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability. *Molecular Cell*, *43*(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.007>
- Murphy, L. O., & Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 31, Issue 5, pp. 268–275). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.03.009>
- Nassiri, M., Liu, J., Kulak, S., Uwiera, R. R. E., Aird, W. C., Ballermann, B. J., & Jahroudi, N. (2010). Repressors NFI and NFY participate in organ-specific regulation of von willebrand factor promoter activity in transgenic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(7), 1423–1429. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.206680>
- Nie, D., Di Nardo, A., Han, J. M., Baharanyi, H., Kramvis, I., Huynh, T., Dabora, S., Codeluppi, S., Pandolfi, P. P., Pasquale, E. B., & Sahin, M. (2010). Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nature Neuroscience*, *13*(2), 163–172. <https://doi.org/10.1038/nn.2477>
- Nilsen, T. W. (2007). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. In *Trends in Genetics* (Vol. 23, Issue 5, pp. 243–249). Trends Genet. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.011>
- Nomura, W., & Inoue, Y. (2015). Methylglyoxal Activates the Target of Rapamycin Complex 2-Protein Kinase C Signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(7), 1269–1280. <https://doi.org/10.1128/mcb.01118-14>

- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., & Mikoshibat, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, 14(5), 899–912. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90329-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90329-1)
- Olson, E. C., & Walsh, C. A. (2002). Smooth, rough and upside-down neocortical development. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 12, Issue 3, pp. 320–327). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00305-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00305-2)
- Ozanne, B. W., Spence, H. J., McGarry, L. C., & Hennigan, R. F. (2006). Invasion is a genetic program regulated by transcription factors. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 16, Issue 1, pp. 65–70). Curr Opin Genet Dev. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.12.012>
- Park, S., Pak, J., Jang, I., & Cho, J. W. (2014). Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.047>
- Peng, Y., & Jahroudi, N. (2002). The NFY transcription factor functions as a repressor and activator of the von Willebrand factor promoter. *Blood*, 99(7), 2408–2417. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.7.2408>
- Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R., & Francis, F. (2019). Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13, p. 381). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00381>
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., Finck, B. N., & Sabatini, D. M. (2011). MTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway. *Cell*, 146(3), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- 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>
- Polak, P., Cybulski, N., Feige, J. N., Auwerx, J., Rüegg, M. A., & Hall, M. N. (2008). Adipose-Specific Knockout of raptor Results in Lean Mice with Enhanced Mitochondrial Respiration. *Cell Metabolism*, 8(5), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.003>
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Levers, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L., & Schulze, A. (2008). SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth. *Cell Metabolism*, 8(3), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>
- Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M., & Hynes, R. O. (1997). Developmental Defects in Mouse Embryos Lacking N-Cadherin. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 181).

- Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., & Winter, J. (2014). miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *The EMBO Journal*, *33*(8), 906–920. <https://doi.org/10.1002/embj.201386591>
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, *145*(1), 61–83. <https://doi.org/10.1002/cne.901450105>
- Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: Systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*, *183*(4123), 425–427. <https://doi.org/10.1126/science.183.4123.425>
- Ramamoorthi, K., Fropf, R., Belfort, G. M., Fitzmaurice, H. L., McKinney, R. M., Neve, R. L., Otto, T., & Lin, Y. (2011). Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation. *Science*, *334*(6063), 1669–1675. <https://doi.org/10.1126/science.1208049>
- Reed, B. D., Charos, A. E., Szekely, A. M., Weissman, S. M., & Snyder, M. (2008). Genome-Wide Occupancy of SREBP1 and Its Partners NFY and SP1 Reveals Novel Functional Roles and Combinatorial Regulation of Distinct Classes of Genes. *PLoS Genetics*, *4*(7), e1000133. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000133>
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustarella, F., Dobyns, W. B., Caskey, C. T., & Ledbetter, D. H. (1993). Isolation of a Miller-Dicker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature*, *364*(6439), 717–721. <https://doi.org/10.1038/364717a0>
- Rice, D. S., & Curran, T. (2001). Role of the Reelin signaling pathway in central nervous system development. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24, pp. 1005–1039). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA . <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1005>
- Rini, B. I. (2008). Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 14, Issue 5, pp. 1286–1290). American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4719>
- Rivera, C., Ludwig, A., Uvarov, P., Pellegrino, C., Thomas-Crusells, J., Schuchmann, S., Saarna, M., & Airaksinen, M. S. (2011). Neurturin evokes MAPK-dependent upregulation of Egr4 and KCC2 in developing neurons. *Neural Plasticity*, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/641248>
- Rosner, M., & Hengstschläger, M. (2008). Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: Rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Human Molecular Genetics*, *17*(19), 2934–2948. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn192>
- Ross, M., & Dobyns, W. (2001). *Lissencephaly with Cerebellar Hypoplasia (LCH): A Heterogeneous Group of Cortical Malformations*. <https://doi.org/10.1055/s-2001-19120>
- Rouso, D. L., Pearson, C. A., Gaber, Z. B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., Morrisey, E. E., & Novitch, B. G. (2012). Foxp-Mediated Suppression of N-Cadherin Regulates Neuroepithelial Character and Progenitor Maintenance in the CNS. *Neuron*, *74*(2), 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.024>
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (1994). RAFTI: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs. In *Cell* (Vol. 78).

- Saito, K., Dubreuil, V., Arai, Y., Wilsch-Bräuninger, M., Schwudke, D., Saher, G., Miyata, T., Breier, G., Thiele, C., Shevchenko, A., Nave, K. A., & Huttner, W. B. (2009). Ablation of cholesterol biosynthesis in neural stem cells increases their VEGF expression and angiogenesis but causes neuron apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(20), 8350–8355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903541106>
- Sala, C., Futai, K., Yamamoto, K., Worley, P. F., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2003). Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *Journal of Neuroscience*, *23*(15), 6327–6337. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-15-06327.2003>
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, *320*(5882), 1496–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>
- Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A., & Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell*, *25*(6), 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Santini, E., Huynh, T. N., MacAskill, A. F., Carter, A. G., Pierre, P., Ruggero, D., Kaphzan, H., & Klann, E. (2013). Exaggerated translation causes synaptic and behavioural aberrations associated with autism. *Nature*, *493*(7432), 411–415. <https://doi.org/10.1038/nature11782>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, *22*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>
- 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*, *3*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms2295>
- Schafer, B. L., Bishop, R. W., Kratunis, V. J., Kalinowski, S. S., Mosley, S. T., Gibson, K. M., & Tanaka, R. D. (1992). Molecular cloning of human mevalonate kinase and identification of a missense mutation in the genetic disease mevalonic aciduria. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(19), 13229–13238. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42199-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42199-0)
- Schroeder, F., Jefferson, J. R., Kier, A. B., Knittel, J., Scallen, T. J., Wood, W. G., & Hapala, I. (1991). Membrane Cholesterol Dynamics: Cholesterol Domains and Kinetic Pools. *Experimental Biology and Medicine*, *196*(3), 235–252. <https://doi.org/10.3181/00379727-196-43185>
- Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. In *Molecular Cell* (Vol. 40, Issue 2, pp. 310–322). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>

- 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>
- Simao, G., Raybaud, C., Chuang, S., Go, C., Snead, O. C., & Widjaja, E. (2010). Diffusion tensor imaging of commissural and projection white matter in tuberous sclerosis complex and correlation with tuber load. *American Journal of Neuroradiology*, *31*(7), 1273–1277. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2033>
- Song, Y., Ori-McKenney, K. M., Zheng, Y., Han, C., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2012). Regeneration of *Drosophila* sensory neuron axons and dendrites is regulated by the Akt pathway involving Pten and microRNA bantam. *Genes and Development*, *26*(14), 1612–1625. <https://doi.org/10.1101/gad.193243.112>
- Sosanya, N. M., Huang, P. P. C., Cacheaux, L. P., Chen, C. J., Nguyen, K., Perrone-Bizzozero, N. I., & Raab-Graham, K. F. (2013). Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *Journal of Cell Biology*, *202*(1), 53–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212089>
- Spiegel, I., Mardinly, A. R., Gabel, H. W., Bazinet, J. E., Couch, C. H., Tzeng, C. P., Harmin, D. A., & Greenberg, M. E. (2014). Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs. *Cell*, *157*(5), 1216–1229. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.058>
- Stan, A., Pielarski, K. N., Brigadski, T., Wittenmayer, N., Fedorchenko, O., Gohla, A., Lessmann, V., Dresbach, T., & Gottmann, K. (2010). Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(24), 11116–11121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914233107>
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. In *Neuroscience* (Vol. 341, pp. 112–153). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(1), 467–472. <https://doi.org/10.1073/pnas.012605299>
- Tarabykin, V. (2001). *Upper cortical layers and the subventricular zone*.
- Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005). 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>
- 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>
- Tian, B., & Manley, J. L. (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: The long and short of it. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 38, Issue 6, pp. 312–320). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.03.005>
- Tili, E., Michaille, J. J., & Calin, G. A. (2008). Expression and function of micro RNAs

- in immune cells during normal or disease state. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 5, Issue 2, pp. 73–79). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijms.5.73>
- Tiruchinapalli, D. M., Ehlers, M. D., & Keene, J. D. (2008). *RNA Biology Activity-dependent expression of RNA binding protein HuD and its association with mRNAs in neurons*. <https://doi.org/10.4161/rna.5.3.6782>
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, *35*(1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00748-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00748-1)
- Tsai, P. T., Greene-Colozzi, E., Goto, J., Anderl, S., Kwiatkowski, D. J., & Sahin, M. (2013). Prenatal rapamycin results in early and late behavioral abnormalities in wildtype C57Bl/6 Mice. *Behavior Genetics*, *43*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s10519-012-9571-9>
- Tsang, C. K., Liu, H., & Zheng, X. F. S. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- And III-transcribed genes. *Cell Cycle*, *9*(5), 953–957. <https://doi.org/10.4161/cc.9.5.10876>
- Tyssowski, K. M., DeStefino, N. R., Cho, J. H., Dunn, C. J., Poston, R. G., Carty, C. E., Jones, R. D., Chang, S. M., Romeo, P., Wurzelmann, M. K., Ward, J. M., Andermann, M. L., Saha, R. N., Dudek, S. M., & Gray, J. M. (2018). Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. *Neuron*, *98*(3), 530–546.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.001>
- Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P. R., Kozma, S. C., Auwerx, J., & Thomas, G. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, *431*(7005), 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature02866>
- Van Maldergem, L., Hou, Q., Kalscheuer, V. M., Rio, M., Doco-Fenzy, M., Medeira, A., de Brouwer, A. P. M., Cabrol, C., Haas, S. A., Cacciagli, P., Moutton, S., Landais, E., Motte, J., Colleaux, L., Bonnet, C., Villard, L., Dupont, J., & Man, H. Y. (2013). Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. *Human Molecular Genetics*, *22*(16), 3306–3314. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt187>
- Velazquez, F. N., Caputto, B. L., & Boussin, F. D. (2015). c-Fos importance for brain development. In *Aging* (Vol. 7, Issue 12, pp. 1028–1029). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/aging.100862>
- Wang, B. T., Ducker, G. S., Barczak, A. J., Barbeau, R., Erle, D. J., & Shokat, K. M. (2011). The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(37), 15201–15206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103746108>
- Wang, X., & Proud, C. G. (2011). MTORC1 signaling: What we still dont know. In *Journal of Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 206–220). J Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq038>
- Waterham, H. R. (2006). Defects of cholesterol biosynthesis. In *FEBS Letters* (Vol. 580, Issue 23, pp. 5442–5449). FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.027>
- Wei, G., Wang, L., Dong, D., Teng, Z., Shi, Z., Wang, K., An, G., Guan, Y., Han, B., Yao, M., & Xian, C. J. (2018). Promotion of cell growth and adhesion of a peptide

- hydrogel scaffold via mTOR/cadherin signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 822–829. <https://doi.org/10.1002/jcp.25864>
- Winkles, J. A. (1997). Serum- and Polypeptide Growth Factor-Inducible Gene Expression in Mouse Fibroblasts. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 58, Issue C, pp. 41–78). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60033-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60033-1)
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. In *Cell* (Vol. 124, Issue 3, pp. 471–484). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>
- Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H., & Nukina, N. (2008). Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *EMBO Journal*, 27(6), 827–839. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.23>
- Yamanaka, T., Miyazaki, H., Tosaki, A., Maity, S. N., Shimogori, T., Hattori, N., & Nukina, N. (2020). Gene expression profiling in neuronal cells identifies a different type of transcriptome modulated by NF-Y. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78682-8>
- Yang, H., Yang, X., Lang, J. C., & Chaum, E. (2006). Tissue culture methods can strongly induce immediate early gene expression in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(6), 1560–1569. <https://doi.org/10.1002/jcb.20877>
- Yoon, B. C., Zivraj, K. H., & Holt, C. E. (2009). Local translation and mRNA trafficking in axon pathfinding. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 48, 269–288. [https://doi.org/10.1007/400\\_2009\\_5](https://doi.org/10.1007/400_2009_5)
- Zhang, J., Woodhead, G. J., Swaminathan, S. K., Noles, S. R., McQuinn, E. R., Pisarek, A. J., Stocker, A. M., Mutch, C. A., Funatsu, N., & Chen, A. (2010). Cortical Neural Precursors Inhibit Their Own Differentiation via N-Cadherin Maintenance of  $\beta$ -Catenin Signaling. *Developmental Cell*, 18(3), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.025>
- 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>



