

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Psychischen Gesundheit
Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Kindes- und
Jugendalters
Direktorin: Prof. Dr. Christine M. Freitag

**Einfluss einer mTOR-Überaktivierung auf die neuronale
Zellmorphologie in-vitro**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Johannes Ludwig

aus Trier

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent/in: Prof. Dr. Christine M. Freitag
Korreferent/in: Prof. Dr. Dr. Michael Ronellenfitsch
Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2023

Inhaltsverzeichnis

I. Schriftliche Erklärung	6
II. Tabellenverzeichnis	7
III. Abbildungsverzeichnis	7
IV. Abkürzungen.....	7
V. Zusammenfassung	9
VI. Abstract.....	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Epilepsie.....	13
1.1.1 Definition.....	14
1.1.2 Klassifikation.....	14
1.1.3 Ätiologie.....	16
1.1.4 Genetik	17
1.2 Mechanistic target of Rapamycin (mTOR)	17
1.2.1 MTOR-assoziierte Epilepsien	18
1.2.2 Tuberöse Sklerose.....	19
1.2.3 GATOR1 - assoziierte Epilepsien	20
1.2.4 DEPDC5 - assoziierte Epilepsien	22
1.3 DEPDC5-Knockout: Funktionelle und morphologische Studien	22
1.4 SH-SY5Y-Neuroblastom-Zelllinie	26
1.5 Diagnostik genetisch bedingter Epilepsien.....	27
1.6 Zielsetzung.....	28
2 Methoden.....	30
2.1 Zellkultur.....	30
2.2 Transfektion	30
2.3 DEPDC5-Knockout.....	31
2.3.1 sgRNA-Design.....	31

2.3.2	Klonierung der sgRNA	32
2.3.3	Einzelzellselektion	33
2.4	Knockout-Validierung auf DNA-, RNA- und Proteinebene.....	33
2.4.1	DNA-Sequenzierung.....	33
2.4.2	Real-Time-RT-PCR	34
2.4.3	Western Blot	35
2.5	Morphologische Analyse	37
2.5.1	Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	37
2.5.2	Sholl-Analyse.....	37
2.6	Statistische Methoden	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	CRISPR/Cas9 induziert DEPDC5-Knockout	41
3.2	Validierung des Knockouts auf RNA- und Proteinebene.....	44
3.3	DEPDC-5-Knockout zeigt mTOR-Überaktivierung.....	45
3.4	Morphologische Validierung des DEPDC5-Knockouts	46
3.4.1	Zellgrößenbestimmung	46
3.4.2	Neuronale Differenzierung.....	46
4	Diskussion	49
4.1	CRIPSR/Cas9 ist eine geeignete Methode zur Genom-Editierung in SH-SY5Y	49
4.2	DEPDC5-KO-SH-SY5Y zeigt keine Reduktion an DEPDC5-mRNA ...	50
4.3	DEPDC5-KO-SH-SY5Y zeigen verlässlich mTOR-Überaktivierung....	50
4.4	Einfluss des DEPDC5-KO auf die Zellgröße	51
4.5	Einfluss des DEPDC5-KO auf die neuronale Struktur.....	52
4.6	Erklärungsansätze für Unterschiede in der neuronalen Morphologie ..	53
4.7	Vergleich des SH-SY5Y-Modells mit alternativen Versuchsmodellen .	54
4.8	SH-SY5Y-Zellmodelle können einen Beitrag in der Epilepsieforschung leisten.....	57

4.9	Limitationen.....	58
4.10	Ausblick.....	60
5	Fazit.....	61
6	Danksagung.....	79
7	Lebenslauf.....	80

I. Schriftliche Erklärung

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss einer mTOR-Überaktivierung auf die neuronale Zellmorphologie in-vitro am Zentrum der Psychischen Gesundheit, in der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Christine M. Freitag mit Unterstützung durch Prof. Dr. Andreas Geburtig-Chiocchetti ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 GATOR1-Phanotyp: Epilepsieformen	21
Tabelle 2 GATOR1-Phanotyp: Klinische Charakteristika.....	21
Tabelle 3 Sholl-Analyse: Erhobene Parameter.....	39
Tabelle 5 Off-Target-Analyse	42
Tabelle 4 Prüfung auf vorzeitiges Stoppcodon	42
Tabelle 6 Vor- und Nachteile neuronaler Zellmodelle	55

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Regulatoren des mTOR-Signalwegs und deren Assoziation mit epileptischen Anfällen	19
Abbildung 2 CRISPR-Cas9 Design und Ergebnisse der Sangersequenzierung.....	43
Abbildung 3 Validierung DEPDC5-KO auf RNA- und Protein-Ebene.....	45
Abbildung 4 Prüfung auf mTOR-Überaktivierung	45
Abbildung 5 Zellgrößenbestimmung mittels Durchflusszytometrie.....	47
Abbildung 6 Neuronale Differenzierung	48

IV. Abkürzungen

Gen/Protein	Vollständiger Name
4EBP	eIF4E Binding Protein
ACTB	Beta-Aktin
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	AKT serine/threonine kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosine monophosphate-activated kinase
BDNF	Brain-derived-growth-factor
CLIP-170	cytoplasmic linker protein of 170 kDa
DEPDC5	Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) domain-containing protein 5
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATOR1-Komplex	Gap Activity Toward Rags 1-Komplex
GUSB	β-Glucuronidase
KICSTOR-Komplex	KPTN, ITFG2, C12orf66 and SZT2-containing regulator of mTORC1
MAP2	Mikrotubuli-assoziierte Protein 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mechanistic target of rapamycin complex 2
NPRL2	Nitrogen Permease Regulator 2-Like Protein
NPRL3	Nitrogen Permease Regulator 3-Like Protein
PKD1	Phosphoinositide-dependent kinase 1

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIK3R2	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2
POL2	DNA-Polymerase II
PTEN	phosphatase and tensin homolog
Rheb	Ras homolog, mTORC1 binding
rpS6	Ribosomal protein S6
S6K1	p70S6 Kinase 1- Komplex
SNA1A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1
STRADA	STE20 related adaptor alpha
TSC	Tuberous sclerosis Complex
TSC1	TSC Complex Subunit 1
TSC2	TSC Complex Subunit 2

Abkürzung

Definition

APS	Ammoniumperoxidsulfat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CNV	Copy-number-variations
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCD	Fokale kortikale Dysplasien
FCS	Fetales Kälber Serum
FFEVF	Familial focal epilepsy with variable foci
<i>HDR</i>	Homology-directed repair
hNPCs	humane neurale Progenitorzellen
ILAE	International League Against Epilepsy
iPSC	induced pluripotent stem cells
KO	Knockout
mNPC	mouse neural progenitor cells
N2aC	mouse neuro-blastoma cells
<i>NEJ</i>	Nonhomologous end joining
NMD	Nonsense-mediated decay
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RA	Retinsäure
RNA	Ribonucleic acid
sgRNA	single-guiding RNAs
SHE	Sleep-related hypermotor epilepsy
shRNA	Small hairpin RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism; Einzelnukleotid-Polymorphismus
SUDEP	Sudden unexpected death in epilepsy
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan
TS	Tuberöse Sklerose
WGCNA	Weighted Gene Co-expression Network Analysis

V. Zusammenfassung

Hintergrund

Epilepsie bezeichnet eine Erkrankung, welche durch eine anhaltende Prädisposition für Symptome, die im Zusammenhang mit einer ungewöhnlich starken oder synchronisierten elektrischen Aktivität des Gehirns auftreten (=epileptischer Anfall) charakterisiert ist. Mutationen in dem Gen DEPDC5 (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) domain-containing protein 5) sind mit fokalen Epilepsien assoziiert und führen in Tiermodellen und humanen Modellen zu einer Überaktivierung des mTOR-Signalweges. Auf neuromorphologischer Ebene zeigt sich die mTOR-Überaktivierung durch eine Vergrößerung des Zelldurchmessers und einer zunehmenden Verästelung der Neuriten. Ziel dieser Studie war es, die morphologischen Auswirkungen der DEPDC5-assoziierten mTOR-Überaktivierung in der SH-SY5Y-Neuroblastomzelllinie zu untersuchen. Dadurch soll eine Einschätzung getroffen werden, ob das im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen bereits gut etablierte SH-SY5Y-Zellmodell auch bei der Untersuchung epilepsieassoziiierter Pathomechanismen zum Einsatz kommen kann.

Methoden

Unter Einsatz der CRISPR/Cas9-Methode wurden Knockout(KO)-Mutationen in Exon 2 und Exon 3 des DEPDC5-Gens erzeugt und diese mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Danach wurden die Knockouts auf RNA- und Proteinebene, durch Real-time-RT-PCR und Western Blot validiert. Die bestätigten homozygoten DEPDC5-KO-Zelllinien wurden anschließend mittels Western Blot auf eine mTOR-Überaktivierung untersucht. Zuletzt erfolgte die neuromorphologische Validierung des DEPDC5-KO. Die Zellgröße proliferierender SH-SY5Y wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Zudem bestimmten wir die neuronale Architektur differenzierter SH-SY5Y unter Einsatz der Sholl-Analyse.

Ergebnisse

Es konnten vier unabhängige DEPDC5-KO-SH-SY5Y-Zelllinien mit homozygoten Indel-Mutationen und vorzeitigem Stoppcodon in Exon 3 generiert werden. Die erwartete Reduktion an DEPDC5-mRNA konnte mittels Real-time

RT-PCR nicht festgestellt werden. Die Abwesenheit des Proteins konnte durch Western Blot aber gezeigt werden. Funktionell konnte für alle Zelllinien eine mTOR-Überaktivierung mittels Western Blot nachgewiesen werden. Dabei konnte phosphoryliertes AKT (AKT serine/threonine kinase 1) als stabilster Marker etabliert werden. Auf neuromorphologischer Ebene ließ sich ein Trend in Richtung vergrößertem Zelldurchmesser bei verlängertem Auswachsen der Neuriten feststellen, wobei sich für das Modell Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen ergaben.

Diskussion

In dieser Studie gelang es erstmals, den Zusammenhang zwischen DEPDC5-KO und einer mTOR-Überaktivierung in der onkogenen SH-SY5Y-Zelllinie zu replizieren. Das verlängerte Auswachsen der Neuriten, bei jedoch gleichbleibender Anzahl peripherer Verästelungen, stellt dabei einen neuen Befund dar und könnte durch die frühe neuronale Entwicklungsstufe des SH-SY5Y-Zellmodells erklärt werden. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich sagen, dass das robuste und kostengünstige SH-SY5Y-Zellmodell insbesondere für high-throughput Methoden und Screeningassays ein geeignetes Modell ist. Durch die Kombination mit reiferen Zellmodellen, wie beispielsweise iPSCs (*induced pluripotent stem cells*), könnte der Phänotyp eines DEPDC5-KO und anderer mTOR-assoziiierter Epilepsien, möglichst umfassend in-vitro dargestellt werden.

VI. Abstract

Introduction

Epilepsy is a common neurological disorder, where symptoms are caused by excessive electrical activity referred as epileptic seizures. Loss-of-function mutations of DEPDC5 (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) domain-containing protein 5) have been shown to result in mTOR-hyperactivation in human and animal models and are associated with focal epilepsies. Neuromorphological models of mTOR-hyperactivation show bigger soma size and higher neurite branching complexity. Therefore, the goal of this study was to investigate the impact of a DEPDC5-related mTOR-hyperactivation on SH-SY5Y neuroblastoma cells to evaluate SH-SY5Y as potential cellular model for further epilepsy research.

Methods

We used a CRISPR/Cas9-method to induce mutations in exon 2 and exon 3 of the DEPDC5 gene in SH-SY5Y. Potential DEPDC5-knockout(KO)-cell lines were then validated using DNA sequencing, real-time-RT-PCR and western blot. All validated DEPDC5-KO-SH-SY5Y were functionally validated for mTOR-hyperactivation by western blot. Furthermore, we analyzed the soma size of proliferating DEPDC5-KOs using fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) and confirmed differences in the neuronal architecture of differentiating SH-SY5Y with Sholl-analysis.

Results

We generated four independent DEPDC5-KO-SH-SY5Y-cell lines with homozygous indel-mutations resulting in a frameshift mutation in exon 3. We didn't see reduction of DEPDC5 mRNA, but DEPDC5 protein was absent in western blotting for all KO-SH-SY5Y cell lines. Functional analysis showed mTOR-hyperactivation, with p-AKT being the most stable marker. Neuromorphological analysis showed high clonal variability with a trend towards increased soma size and longer neurite outgrowth.

Discussion

This is the first study replicating the influence of DEPDC5-KO related mTOR-hyperactivation in the human SH-SY5Y cell line. In contrast to most of the published models Sholl-analysis showed longer neurite outgrowth, but no increased neuronal branching, which could be explained by the early developmental stage that can be mimicked by differentiation of SH-SY5Y. We conclude that the robust and cost-effective SH-SY5Y cell line is an effective model especially for high-throughput methods and screening assays. However, the large variability should be addressed in future studies. The combination of SH-SY5Y with more mature cell lines like iPSCs (induced pluripotent stem cells) might thus be the most precise tool to investigate the in-vitro phenotype of DEPDC5-KO and other mTOR-associated epilepsies.

1 Einleitung

1.1 Epilepsie

Epilepsien sind eine der häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen mit einer weltweiten Prävalenz von über 70 Millionen Betroffenen ¹ und einer Lebenszeitprävalenz von 7,6 in 1000 Personen ². Kinder mit Epilepsie haben gegenüber der Normalbevölkerung eine 3-fach erhöhte Mortalität ³. Zudem ist die Diagnose einer Epilepsie mit einem erhöhten Risiko für Einschränkung und Behinderung verbunden ⁴.

Fortschritte in der Gentechnik (insb. Next-Generation-Sequencing) haben dazu beigetragen, dass zuletzt zunehmend Genmutationen identifiziert werden konnten, welche zur Entstehung von Epilepsien beitragen ⁵. Es ist davon auszugehen, dass 50% der Epilepsien eine genetische Ursache haben ^{6,7}.

Die medikamentöse Behandlung von Epilepsien beschränkte sich in den vergangenen Jahrzehnten überwiegend darauf die Häufigkeit epileptischer Anfälle zu reduzieren. Trotz der großen Heterogenität in der Genese der Krampfanfälle wurden patientenindividuelle oder genetische Faktoren bisher nur eingeschränkt berücksichtigt ^{8,9}. Im Gegensatz zu der stetigen Zunahme an zugelassenen Antiepileptika reduzierte sich der Anteil an unkontrollierten Epilepsien (ca. 1/3 aller Patienten) nur geringfügig ¹⁰. Hoffnung auf neue Fortschritte in der Therapie der Epilepsie bringt der Ansatz der Präzisionsmedizin. Als Präzisionsmedizin wird „die Behandlung, die auf den einzelnen Patienten abgestimmt ist auf der Grundlage von genetischen Biomarkern, phänotypischen und psychosozialen Merkmalen“ ¹¹ bezeichnet. Die Berücksichtigung genetischer Biomarker in der Präzisionsmedizin erfordert dabei ein genaues Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen. Patienten mit Mutationen in dem Gen *DEPDC5* (Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin (DEP) domain-containing protein 5), zeigen überwiegend fokale Epilepsien und häufige Pharmakoresistenz ¹². *DEPDC5* ist ein Inhibitor des Mechanistic target of Rapamycin (mTOR)-Signalweges, weshalb als zugrundeliegender Pathomechanismus eine mTOR -Überaktivierung vermutet wird ¹³. Diese Arbeit untersucht im humanen SH-SY5Y-in-vitro-Zellmodell den neuromorphologischen und funktionellen Phänotyp des *DEPDC5*-Knockouts. Die dabei eingesetzte SH-

SY5Y-Zelllinie ist ein etabliertes Zellmodell onkogenen Ursprungs mit vielfältigen Vorteilen (humaner Ursprung, kostengünstige und leichte Kultivierbarkeit)¹⁴.

Das Ziel dieser Studie ist ein SH-SY5Y-DEPDC5-Knockout Zellmodell zu generieren und anschließend zu charakterisieren. Dabei soll geprüft werden welche Aspekte des, unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur, zu erwartenden Phänotypen dargestellt werden können. Anschließend soll unter Abwägung der Vor- und Nachteile der zur Verfügung stehenden Zellkulturmethoden eine Einschätzung erfolgen, ob das SH-SY5Y-Zellmodell in Zukunft für die Erforschung zugrundeliegender Pathomechanismen von Epilepsien ein geeignetes Modell sein könnte.

1.1.1 Definition

Die zuständige Task Force der International League Against Epilepsy (ILAE) definiert einen epileptischen Anfall durch das vorübergehende Auftreten von Zeichen oder Symptomen, die durch eine ungewöhnlich starke oder synchronisierte elektrische Aktivität des Gehirns ausgelöst werden. Die Erkrankung des Gehirns, welche durch eine anhaltende Prädisposition für solche epileptische Anfälle charakterisiert ist, wird als Epilepsie bezeichnet^{15,16}.

In der klinischen Praxis wird nach dem aktuellen Vorschlag der ILAE eine Epilepsie beim Vorliegen von einem der folgenden Kriterien vergeben:

- 1) Mindestens zwei symptomatische Anfälle mit mindestens 24 Stunden Abstand.
- 2) Ein symptomatischer Anfall und die Wahrscheinlichkeit für weitere epileptische Anfälle gleich dem allgemeinen Wiederholungsrisiko ($\geq 60\%$) nach zwei symptomatischen Anfällen über die nächsten 10 Jahre.
- 3) Diagnose eines Epilepsiesyndroms. D.h. bei bestehender Evidenz für ein Epilepsiesyndrom (s. Absatz 1.1.2), wird die Diagnose einer Epilepsie vergeben, auch wenn das Risiko für epileptische erneute Anfälle niedrig ist.

1.1.2 Klassifikation

Im Anschluss an die Diagnose einer Epilepsie kommt der Klassifikation eine große Bedeutung zu. Sie vereinfacht die Kommunikation im klinischen Alltag und lässt Aussagen zur Prognose und Auswahl von Therapeutika zu. Daneben hat

sie einen hohen Stellenwert in der Grundlagenforschung und bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen. Es können verschiedene Stufen der Klassifikation vorgenommen werden, abhängig von den zur Verfügung stehenden Ressourcen¹⁷⁻¹⁹.

Die Klassifikation folgt dabei einem dreistufigen Prozess:

1) Klassifikation der Anfallsform

Der epileptische Anfall wird anhand des Ursprungs der elektrischen Erregung eingeteilt. Ist das neuronale Netzwerk, in dem die elektrische Aktivität beginnt, auf eine Hemisphäre des Gehirns beschränkt, so spricht man von einem fokalen Beginn. Als generalisiert wird ein Anfall bezeichnet, wenn sich die elektrische Aktivität in einem bilateralen, d.h. beide Hemisphären betreffenden, Netzwerk ausbreitet. Ist keine klare Zuordnung zu einer der beiden erstgenannten Kategorien möglich, so wird der epileptische Anfall als unbekannt klassifiziert²⁰.

2) Klassifikation der Art der Epilepsie

Im zweiten Schritt erfolgt die Zuordnung zu einer Epilepsieart. Dies setzt voraus, dass der behandelnde Arzt die Diagnose einer Epilepsie, nach den oben genannten Kriterien, bereits gestellt hat. Mögliche Zuordnungen sind je nach Anfallsmuster: fokale Epilepsie, generalisierte Epilepsie, kombiniert generalisierte und fokale Epilepsie. Eine unklassifizierte Epilepsie sollte dann vergeben werden, wenn nicht ausreichend Informationen vorliegen, um zu bestimmen, ob diese fokal oder generalisiert verläuft.

3) Diagnose eines Epilepsiesyndroms

Sofern möglich wird in einem dritten Schritt das Epilepsiesyndrom diagnostiziert. Die Diagnose ergibt sich aus der Zusammenschau verschiedener charakteristischer Merkmale. Dies können spezifische Anfallsmuster, EEG- oder MRT-Befunde, altersabhängige Faktoren, anfallsauslösende Reize oder komorbide Erkrankungen sein. Ein Zusammenhang zwischen einem Epilepsiesyndrom und einer gesicherten Ätiologie liegt nicht zwingend vor, gleichwohl können durch die Diagnose

eines Syndroms häufig Aussagen zur Prognose und Behandlung getroffen werden.

1.1.3 Ätiologie

Auf jeder Stufe des diagnostischen Prozesses sollte eine Einschätzung bezüglich der auslösenden Faktoren getätigt werden. Dabei stellt die Gruppe der Epilepsien im Hinblick auf die zugrundeliegende Ursache eine sehr heterogene Gruppe dar. Die ILAE hat diesbezüglich sechs unterschiedlichen Subgruppen definiert ^{17,18}.

1) Strukturell

Unter Berücksichtigung bildgebender Verfahren ist eine strukturelle Läsion des Gehirns als wahrscheinliche Ursache der epileptischen Anfälle anzunehmen. Strukturelle Läsionen können z.B. durch einen Schlaganfall entstehen, aber auch eine genetische oder infektiöse Genese haben.

2) Genetisch

Die Epilepsie ist auf eine genetische Mutation zurückzuführen, welche bekanntermaßen epileptische Anfälle auslöst.

3) Infektiös

Die Epilepsie entsteht als direkte Folge einer bekannten Infektion und epileptische Anfälle sind ein Kernsymptom dieser (z.B. im Rahmen einer HIV-Infektion). Die infektiologische Ätiologie ist weltweit die häufigste ²¹.

4) Metabolisch

Die Epilepsie entsteht als direkte Folge, einer bekannten oder angenommenen metabolischen Störung und epileptische Anfälle sind ein Kernsymptom dieser. Mögliche Beispiele sind Porphyrrie, Urämie oder Störungen des Aminosäurestoffwechsels.

5) Immun vermittelt

Die Epilepsie entsteht als direkte Folge einer autoimmun vermittelten Entzündung des zentralen Nervensystems und epileptische Anfälle sind ein Kernsymptom dieser (z.B. Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis).

6) Unbekannt

Die Ursache ist noch nicht bekannt.

Im Folgenden soll auf die genetische Ätiologie genauer eingegangen werden.

1.1.4 Genetik

Das Risiko an einer Epilepsie zu erkranken, wird in vielen Fällen durch die zugrundeliegende Genetik beeinflusst. Ein Verwandter ersten Grades eines Betroffenen mit Epilepsie hat gegenüber der Allgemeinbevölkerung ein 3,3-fach erhöhtes Risiko an einer Epilepsie zu erkranken²². Schätzungen aus Zwillingsstudien gehen von einer Vererbbarkeit zwischen 25 und 70 % aus^{23,24}. Die Identifikation einzelner Gene gestaltet sich dabei schwierig, da der größere Teil der Epilepsien über ein komplexes Vererbungsmuster zu verfügen scheint, d.h. mehrere Mutationen erhöhen in der Summe die Neigung zu epileptischen Anfällen²⁵. Daneben existiert eine Gruppe monogenetischer Epilepsien. Hier führt die Mutation in nur einem Gen, welche vererbt wurde oder de-novo entstanden ist, zu dem Phänotyp²⁶. Wang et al. identifizierten 977 Gene, welche mit Epilepsien assoziiert sind. Hierunter wurden 84 als Epilepsie-Gene (= Gene, welche Epilepsie, oder Syndrome mit Epilepsie als Hauptsymptom auslösen) und 73 als Hirnentwicklung-assoziierte Gene (= Gene, die Fehlbildungen der Hirnentwicklung und Epilepsie gemeinsam auslösen) klassifiziert. In der Gruppe der Epilepsie-Gene codierte der größte Teil der Gene für Proteine, welche Ionen-Kanäle bilden (28 von 84 Genen). In der Gruppe der Hirnentwicklung-assoziierten Gene codierte der größte Teil für Enzyme oder Enzymmodulatoren (24/73). Pathogene Varianten in Regulatoren des mTOR-Signalweges fanden sich dabei unter den Epilepsie-Genen (z.B. *DEPDC5*) und unter den Hirnentwicklungs-assoziierten Genen (z.B. *Tuberous sclerosis Complex (TSC) Subunit 1 (TSC1)* oder *TSC Complex Subunit 2 (TSC2)*)⁵.

1.2 Mechanistic target of Rapamycin (mTOR)

mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche die katalytische Untereinheit zweier eukaryotischer Multiproteinkomplexe darstellt. Diese werden als mTORC1

(mechanistic target of rapamycin complex 1) und mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) bezeichnet. mTORC1 nimmt eine zentrale Rolle in der zellulären Homöostase ein und reguliert das Zellwachstum. mTORC1 registriert verschiedene intra- und extrazelluläre Signale und integriert diese, indem er Proteinsynthese, Genexpression und den Metabolismus beeinflusst ^{27,28}. DEPDC5 bildet zusammen mit den Proteinen NPRL2 (Nitrogen Permease Regulator 2-Like Protein), NPRL3 (Nitrogen Permease Regulator 3-Like Protein) den sogenannten Gap Activity Toward Rags 1 (GATOR1) -Komplex, welcher mTORC1 direkt inhibiert. Ein Einfluss von DEPDC5 auf mTORC2 ist nicht bekannt ²⁹.

Folgende Signale beeinflussen die mTOR-Aktivität:

- 1) Botenstoffe, die an extrazelluläre Rezeptoren binden (z.B. Insulin oder Brain-derived-growth-factor (BDNF) ³⁰.
- 2) intrazelluläre Aminosäurespiegel ²⁸.
- 3) Verhältnis von AMP zu ADP, als Indikator für den Energiestand der Zelle ³¹.

1.2.1 MTOR-assoziierte Epilepsien

In den letzten Jahren wurden zunehmend Gene mit epileptischen Anfällen in Verbindung gebracht, welche die Aktivität von mTOR regulieren. Das am besten erforschte mTOR-assoziierte Syndrom ist die Tuberöse Sklerose (TS) welche durch Mutationen in den Genen *TSC1* und *TSC2* entsteht. Weitere Gene sind: *AKT3*, die Untereinheiten der Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), *PIK3CA*, *PIK3R2* ³², *STRADA* ³³, *PTEN* ³⁴, *Rheb* ^{35,36} *mTOR* ³⁶, sowie die drei Untereinheiten des GATOR1- Komplexes: *DEPDC5* ³⁷, *NPRL2* und *NPRL3* ³⁸ (Abbildung 1).

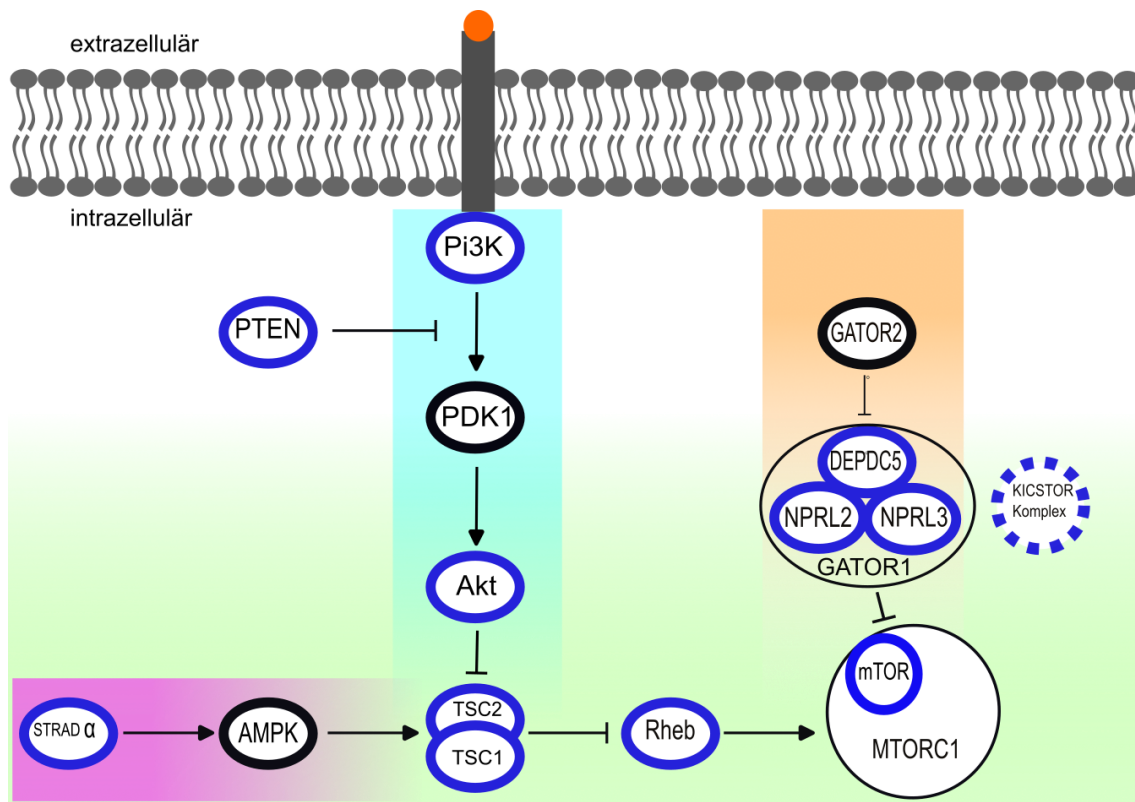


Abbildung 1 Regulatoren des mTOR-Signalwegs und deren Assoziation mit epileptischen Anfällen

Intra- und extrazelluläre Einflüsse beeinflussen die Aktivität von mTOR (lila: AMP/ADP-Verhältnis; türkis: extrazelluläre Botenstoffe, orange: intrazellulärer Aminosäurespiegel). Mutationen in den blau umkreisten Proteinen sind mit epileptischen Anfällen assoziiert. Die Grafik basiert inhaltlich auf dem Review von Moloney et al. ³⁹ und wurde weiter angepasst.

Abkürzungen: STRAD α (STE20-related kinase adaptor alpha), AMPK (adenosine monophosphate-activated kinase), PTEN (Phosphatase and tensin homologue), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), Akt (AKT serine/threonine kinase), Rheb (Ras homolog, mTORC1 binding), KICSTOR-Komplex (KPTN, ITFG2, C12orf66 and SZT2-containing regulator of mTORC1).

1.2.2 Tuberöse Sklerose

TS ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung und wird in den meisten Fällen ausgelöst durch eine loss-of-function-Mutation in den Untereinheiten *TSC1* oder *TSC2* des *Tuberous sclerosis* Komplexes (TSC). *TSC1* und *TSC2* sind negative Regulatoren der mTOR-Aktivität, sodass eine loss-of-function Mutation zu einer mTOR-Überaktivierung führt ^{40,41}. *TSC1* und *TSC2* lassen sich den Hirnentwicklungs-assoziierten Genen zuordnen und *TSC2* gehört zu der

häufigsten Untergruppe der Enzymmodulatoren. Die betroffenen Patienten zeigen benigne Tumoren in unterschiedlichen Organsystemen wie Gehirn, Haut, Augen, Nieren oder Lunge ³¹. Darüber hinaus weisen die Betroffenen häufig neurologische Symptome auf, wie Epilepsie (80-90 % der Betroffenen), geistige Behinderung (60%) und Autismus (25-50%) ²⁸.

TS wird den mTORopathien zugeordnet, einer Gruppe neuronaler Störungen, welche im Zusammenhang mit einer mTOR-Überaktivierung stehen ⁴². Häufige Eigenschaften dieses Phänotyps sind: veränderte neuronale Morphologie, aberrante Schichtung des Kortex, neuronale Übererregbarkeit, epileptische Anfälle und Pharmakoresistenz ^{39,43}.

1.2.3 GATOR1 - assoziierte Epilepsien

Der GATOR1-Komplex reduziert bei niedrigen intrazellulären Aminosäurespiegeln die mTOR-Aktivität ^{28,44}. Eine loss-of-function-Mutation in einer der Untereinheiten führt folglich zu einer mTOR-Überaktivierung ²⁷. Daher werden auch GATOR1-Komplex-assoziierte Epilepsien den mTORopathien zugeordnet. Bei 9% der Patienten mit fokalen Epilepsien liegen Mutationen im GATOR1-Komplex vor und damit stellen sie die häufigste bekannte genetische Ursache fokaler epileptischer Anfälle dar ^{38,45}.

Untersuchungen des Phänotyps aller bekannten Probanden mit *GATOR1*-Mutation ließen phänotypisch keine Unterscheidung zwischen Mutationen in den drei Untereinheiten *DEPDC5*, *NPRL2* oder *NPRL3* zu. Daher wurde ein gemeinsamer GATOR1-Phänotyp charakterisiert, welcher sich aus der Epilepsieform, aber auch weiteren Charakteristika wie z.B. Pharmakoresistenz oder Komorbiditäten zusammensetzt (Tabelle 1 und Tabelle 2) ⁴⁶.

Tabelle 1 GATOR1-Phänotyp: Epilepsieformen

Phänotyp	Häufigkeit	Klinisches Bild
Sleep-related hypermotor epilepsy (SHE)	25%	Schlaf-assoziierte stereotype hyperkinetische oder asymmetrische dystone/tonische Anfälle. Dauer typischerweise < 2 Minuten ⁴⁷ .
Andere fokale Epilepsien	54%	Es kommen frontale, temporale, frontotemporale, occipitale, parietale, zentrotemporale Anfallsmuster vor.
Familial focal epilepsy with variable foci (FFEVF)	9%	Fokale epileptische Anfälle, die innerhalb einer betroffenen Familie an unterschiedlichen Regionen des Gehirns entstehen ⁴⁸ .
Infantile Spasmen	6.6%	Kurze tonische Kontraktionen der axialen Muskulatur (Dauer typischerweise < 3 sec) mit Beginn zwischen dem 3-12 Lebensmonat ⁴⁷ .

Tabelle 2 GATOR1-Phänotyp: Klinische Charakteristika

Phänotyp	Häufigkeit	Erläuterung
Sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP)	9,3%	Plötzlicher Tod bei Epilepsie, ohne Anhalt für ein Trauma oder Ertrinken. Ggf. mit Anhalt für einen vorherigen Epileptischen Anfall, aber ohne Anhalt für einen vorausgegangenen Status epilepticus.
Pharmakoresistenz	50 %	65 % der Probanden mit SHE
Neuronale Migrationsstörungen (engl. malformations of cortical development)	24%	Die Ursache ist eine gestörte Entwicklung des zerebralen Kortex in-utero. Fokale kortikale Dysplasien (engl. focal cortical dysplasias, FCD) stellen die häufigste Untergruppe dar ⁴⁹ .
Kognitive Störungen und/oder psychiatrische Komorbiditäten	60%	z.B. ADHS, oppositionell aufsässiges Verhalten, Autismus-Spektrum-Störungen, Depressionen, Angststörungen.

1.2.4 DEPDC5 - assoziierte Epilepsien

Im Jahr 2013 wurden erstmals Mutationen in *DEPDC5* als ursächlich für die autosomal-dominant vererbte *Familial focal epilepsy with variable foci* (FFEVF) identifiziert ^{37,50}, nachdem diese zuvor Chromosom 22q12 zugeordnet werden konnte ⁵¹. FFEVF ist durch fokale epileptische Anfälle charakterisiert, die innerhalb einer betroffenen Familie an unterschiedlichen Regionen des Gehirns entstehen können. Die meisten Betroffenen haben unauffällige MRT-Aufnahmen des Gehirns, dennoch lassen sich bei einigen Patienten Fehlbildungen der Hirnrinde identifizieren ⁵². In den meisten Fällen sind dies fokale kortikale Dysplasien (FCD). FCD gehören zu der Gruppe der neuronalen Migrationsstörungen, welche auf eine gestörte Entwicklung des Kortex in-utero zurückzuführen sind ⁴⁹. Pathologisch zeichnen sich FCD, durch eine Schichtungsstörung des Kortex aus, welche häufig mit einer mTOR-Überaktivierung assoziiert ist ^{53,54}. Der in Bezug auf DEPDC5 am häufigsten vorkommende Subtyp FCD Typ II ist durch dysmorphe, megalozytäre Neurone charakterisiert, welche ohne (FCD Typ IIa) oder mit (FCD Typ IIb) Ballonzellen vorliegen können. Die Ballonzellen weisen ein vergrößertes Zellsoma und reduziertes Fortsatzwachstum auf, haben einen abnormen Zellkern und exprimieren Marker für Neuronen und Gliazellen ⁵³. Aktuellen Daten zufolge stellen Mutationen in DEPDC5 mit 85% den größten Anteil in der Gruppe der GATOR-1-assoziierten Epilepsien dar ⁴⁶.

1.3 DEPDC5-Knockout: Funktionelle und morphologische Studien

Eine Loss-of function-Mutation in *DEPDC5* führt zu einer Desinhibition von mTOR und folglich zu einem anabolen Zustand der Zelle ⁵⁵. Da eine Mutation im *DEPDC5*, im Gegensatz zu *TSC1* oder *TSC2*, überwiegend neuronale Symptome auslöst, ist der Einfluss eines DEPDC5-Knockouts auf neuronaler Ebene von besonderem Interesse.

Baulac et al. beschrieben vergrößerte, missgebildete Neuronen in Gehirnen von Patienten mit FCD (Typ IIa) und *DEPDC5*-Mutationen. Die Proben wurden bei epilepsiechirurgischen Eingriffen gewonnen ⁵⁶. Scerri et al. konnten eine mTOR-Überaktivierung in zwei Brüdern mit heterozygoten *DEPDC5*

Keimbahnmutationen und FCD (Typ IIa) nachweisen⁵⁷. Hierfür bestimmten sie den Grad der Phosphorylierung von ribosomal protein S6 (rpS6), dem etabliertesten Marker zur Messung der mTOR-Aktivität, denn eine gesteigerte mTOR-Aktivität führt zu einer Zunahme der Phosphorylierung von rpS6^{58,59}. Die Beurteilung der Neuronen aus Gehirnschnitten der gleichen Brüder ergaben 1,6-fach vergrößerte Zellsomata im Vergleich zu Kontrollgehirnen gleichen Alters⁶⁰.

Auch Ribierre et al. konnten in einem epilepsiechirurgischen Resektat eines Patienten mit FCD Typ II vergrößerte Neuronen mit mTOR-Überaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung von rpS6) nachweisen⁶¹.

Homozygote *Depdc-5*-Knockout (*depdc5* *-/-*) -Mäuse starben während der Schwangerschaft. Dabei ließen sich eine reduzierte Gesamtgröße, Leberhypoplasien oder kraniale Dysmorphien feststellen. Die mTOR-Überaktivierung konnte auch hier durch gesteigerte Phosphorylierung von rpS6 nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine reduzierte Phosphorylierung von AKT. AKT ist Teil einer negativen Rückkopplungsschleife, welche die mTOR-Aktivität inhibiert. Eine mTOR-Überaktivierung führt folglich zu einer reduzierten Phosphorylierung von AKT⁵⁸. Mäuse mit einem heterozygoten *Depdc-5*-Knockout waren überlebensfähig, zeigten jedoch keine veränderte neuronale Morphologie oder mTOR-Hyperaktivierung⁶².

In der Folge versuchten mehrere Gruppen mit spezifischeren Knockout-Methoden den zerebralen *depdc-5*-Knockout-Phänotyp abzubilden. Mittels CRISPR/Cas 9 und *in-utero-electroporation* generierte Mäuse mit zerebralen, fokalen homozygoten *Depdc5*-Knockouts waren überlebensfähig und zeigten histopathologisch Pyramidenzellen mit einer gesteigerten Komplexität des Dendritenbaums. Zur Bestimmung der Komplexität wurde die Sholl-Analyse eingesetzt⁶¹.

Mäuse mit einem neuronenspezifischen *depdc5*-Knockout (*depdc5cc+*), mittels Cre/loxP-Rekombination unter dem Synapsin1 Promotor, waren überlebensfähig, zeigten jedoch eine kürzere Lebensspanne. Die Gehirne der *depdc5cc+* Mäuse waren makroskopisch größer und signifikant schwerer als die ihrer Wurfgeschwister. Histopathologisch zeigten die Neurone der *depdc5cc+* Mäuse eine mTOR-Überaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung von rpS6).

Zudem zeigte sich in Schicht V des Kortex vergrößerte Zellsomata, eine gesteigerte Expression von Neurofilament Proteinen, dickere Dendriten und eine gestörte Orientierung der Neuronen⁶³. Dieselbe Gruppe konnte zeigen, dass sich die neuronale Zellgröße, die kortikale Dicke und die Gehirngröße durch die Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin auf das Niveau der Kontrollgehirne reduzieren ließ. Dabei zeigte Rapamycin nur den reduzierenden Effekt bei *depdc5cc+* Mäusen. Auf die Zellgröße von Wildtyp-Mäusen hatte Rapamycin keinen reduzierenden Effekt, was die mTOR-Überaktivierung als zugrundeliegenden Pathomechanismus bestätigte⁶⁴.

Mäuse mit homozygoten hirnspezifischen Mutationen wiesen im Vergleich zu den Kontrollen 1,7-fach größere Zellsomata, Zellen mit abnormer runder Morphologie und eine gesteigerte Verästelung des Dendritenbaumes auf⁶⁵.

Iffland et al. untersuchten einen *depdc5*-Knockdown erstmals in der murinen Zellkultur. mNPC (mouse neural progenitor cells) und N2aC (mouse neuroblastoma cells) zeigten nach dem *depdc5*-Knockdown vergrößerte Zellsomata und mTOR-Überaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung von rpS6). In *depdc5*-knockdown-mNPCs zeigten sich außerdem einen Anstieg an Filopodien, einer Vorläuferstufe von Neuriten. In *depdc5*-knockdown-N2aC zeigte sich während der Differenzierung ein Anstieg an MAP2 (Mikrotubuli-assoziierte Protein 2) - positiven Fortsätzen im Vergleich zu den Kontrollen. Der beschriebene Phänotyp ließ sich in beiden Zelllinien durch die Gabe von Rapamycin auf das Wildtypniveau normalisieren⁶⁰.

In einer weiteren Mausstudie zeigten heterozygote *depdc5*-Knockout-Mäuse einen recht milden Phänotyp (normale Zellgröße, dezent gesteigertes Neuritenwachstum). Daneben zeigten *depdc5*-shRNA- knockdown Zellen mit einer um 80% reduzierten Proteinmenge einen deutlich ausgeprägteren Phänotyp (gesteigerte Zellgröße, gesteigertes Neuritenwachstum). Interessanterweise zeigten auch *depdc5*-shRNA- knockdown Zellen mit einer reduzierten Proteinmenge von 40-50 % einen ausgeprägteren Phänotyp (gesteigerte Zellgröße) im Vergleich zu den heterozygoten *depdc5*-Knockouts. Die Autoren schlossen daraus, dass der Zeitpunkt der Genmutation eine wichtige Rolle im Hinblick auf den Phänotyp spielt^{66,67}.

Im Gegensatz zu den Mausversuchen zeigten heterozygote *depdc5*- Knockout - Ratten vergrößerte Zellsomata und mTOR-Hyperaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung von rpS6). Auch hier erinnerte die Morphologie der Neuronen an FCD. Homozygote *depdc5*-Knockout-Ratten starben ab dem 14,5 *embryonic day* auf Grund eines globalen Wachstumsdefizits ⁶⁸. Rattengehirne mit fokalen homozygoten *depdc5*-Knockouts zeigten eine mTOR-Hyperaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung von rpS6) und nahezu eine Verdopplung der Zellgröße im Vergleich zum Wildtyp, welche durch die Gabe von Rapamycin wieder reduziert wurde ⁶⁹.

Im Zebrafischmodell starben durch CRISPR/Cas9 in Exon 14 erzeugte *depdc5*^{-/-} Larven 14 Tage nach der Fertilisation. Diese zeigten zwar eine mTOR Überaktivierung, jedoch keine abnormen oder dysmorphen Zellen ⁷⁰. Auch eine weitere Gruppe konnte keine auffälligen morphologischen Unterschiede an *depdc5*-morpholinoknockdown-Zebrafischembryonen nachweisen ⁷¹.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist ein humanes *DEPDC5*-Knockout-in-vitro Zellmodell publiziert ⁷². Aus Fibroblasten von Epilepsiepatienten mit heterozygoten *DEPDC5*-Loss-of-function-Mutationen wurden *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) generiert. Die *DEPDC5* haploinsuffizienten iPSCs zeigten eine mTOR-Überaktivierung (gesteigerte Phosphorylierung RPS6) und vergrößerte Zellsomata. Durch die Gabe von Rapamycin reduzierte sich die Größe der Zellsomata wieder auf das Niveau gesunder Kontrollpatienten.

Über den Einfluss eines *DEPDC5*-Knockouts auf die humane Neuritenstruktur ist noch wenig bekannt. Die humane neuronale Morphologie wurde in diesem Zusammenhang bisher vor allem an Gehirnresektaten aus epilepsiechirurgischen Eingriffen untersucht. Dabei konnte nur die Größe der Zellsomata beurteilt werden. Auch das erste publizierte humane in-vitro-Zellmodell von Klofas et al. trifft keine Aussagen zur neuronalen Architektur, zudem wurden als Kontrollen gesunde Kontrollpatienten und keine isogenen Zelllinien verwendet. Somit besteht aktuell weiterer Forschungsbedarf, ein humanes Zellmodell zu etablieren, welches verlässlich den neuronalen Phänotypen repliziert, um Aussagen über den Einfluss einer *DEPDC5*-Mutation auf die neuronale Zellmorphologie treffen zu können. Ein mögliches Zellmodell

stellt die SH-SY5Y-Neuroblastom-Zelllinie dar, welche in der Folge näher beleuchtet werden soll.

1.4 SH-SY5Y-Neuroblastom-Zelllinie

Die SH-SY5Y-Zelllinie stellt einen Subklon der SK-N-SH Zelllinie dar, welche aus humanem metastasiertem Neuroblastomgewebe gewonnen wurde und unter der Zugabe von Retinsäure einen neuronähnlichen Phänotyp entwickelt ⁷³⁻⁷⁵. Die SH-SY5Y Zelllinie ist preisgünstig und unter Standardlaborbedingungen zu kultivieren, was sie bis heute zu einem häufig genutzten Standardzellmodell in der Erforschung neuropsychiatrischer Erkrankungen macht. Wegen seines onkogenen Ursprungs umfasst das SH-SY5Y Genom mehrere Kopienzahlvariationen (engl. copy-number-variations; CNV) ⁷⁶, jedoch ist anzunehmen, dass Gene, die mit der neuronalen Differenzierung oder mit neuropsychiatrischen Krankheiten in Verbindung gebracht werden, davon nicht betroffen sind ⁷⁷. Auch *DEPDC5*, welches auf Chromosom 22 (22q12.2-q12.3) liegt, ist von CNVs nicht betroffen. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass sich auf 22q12.3, benachbart zu *DEPDC5*, eine 62Kb umfassende Deletion befindet ⁷⁶. Zelllinien aus Neuroblastomen sind heterogen und enthalten Precursorzellen, die sich in verschiedene Zelltypen der Neuralleiste entwickeln können ⁷⁸. Dies sind zum einen Precursorzellen für neuronale Zellen und zum anderen Precursorzellen für nicht-neuronale Zellen, wie Schwann-Zellen, Melanozyten oder Gliazellen ⁷⁹. Entsprechend ihrer Morphologie werden die neuronalen Zellen als N-Typ-Zellen und die nicht-neuronalen Zellen, auf Grund des festen Wachstums am Boden der Kulturschale, als S-Typ-Zellen (engl. substrate-adherent) bezeichnet. SY-SY5Y, als Subklon einer neuronalen Precursorzelle, besteht überwiegend aus N-Typ-Zellen, enthält aber auch einen Anteil an S-Typ-Zellen. Zudem kann sich in der Zellkultur der Anteil an N-Typ-SH-SY5Y und S-Typ-SH-SY5Y verändern.

Chiocchetti et al. konnten zeigen, dass die SH-SY5Y- Zelllinie unter der kontinuierlichen Gabe von RA und BDNF für insgesamt 11 Tage ein verlässliches Modell für neuronale Differenzierung in vitro darstellt ^{77,78}.

Dies begründet sich unter anderem durch folgende Punkte:

- 1) Das Protokoll reproduziert den neuron-ähnlichen Phänotyp vorheriger Protokolle mit sequenzieller Gabe von RA und BDNF ⁸⁰.
- 2) Die SH-SY5Y-Zellen erreichen reifere Entwicklungsstufen (neuronale Reifung entsprechend der postkonzeptionellen Woche 15-19) im Vergleich zu den sequenziellen Protokollen.
- 3) Differenzierte SH-SY5Y entwickeln sich zu Zellen mit „kortikaler Identität“ und exprimieren Marker unterschiedlicher neuronaler Subtypen (cholinerg, dopaminerg, serotonerg, gabaerg, glutamaterg, Motoneurone).

1.5 Diagnostik genetisch bedingter Epilepsien

Im klinischen Setting stehen bereits unterschiedliche genetische Diagnosemöglichkeiten für Epilepsien zur Verfügung. Zum Beispiel können große Deletionen oder Duplikationen, wie beispielsweise im Falle des Ringchromosom 20-Syndroms, kostengünstig mittels Karyotypisierung detektiert werden. Zur Detektion kleiner genetischer Veränderungen von einem bis zu wenigen Basenpaaren besteht die Möglichkeit zur Exon-/Genomsequenzierung ⁸¹. Auch wenn die Diagnose einer genetischen Epilepsie für den Großteil der Patienten bisher keine klinische Relevanz hat, kann dies für bestimmte Patientengruppen eine Veränderung der therapeutischen Strategie nach sich ziehen. Beispielsweise konnte bei einem 22-jährigen Patienten mit MRT-negativer-Temporallappenepilepsie und regelmäßigen epileptischen Anfällen trotz antiepileptischer Dreifachmedikation eine Mutation in dem Gen Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1 (SNA1A) identifiziert werden. Auf Grundlage aktueller Forschungsergebnisse, welche ein negatives Outcome epilepsiechirurgischer Eingriffe, sowie eine Zunahme an epileptischen Anfällen unter Carbamazepin bei SNA1A-Mutation beschreiben, wurde auf eine Operation verzichtet und die antiepileptische Medikation auf Perampanel umgestellt. Hierunter zeigte sich eine Anfallsfreiheit bis zum 12-Monate-Follow-up ⁸². Auch für die Untergruppe der Patienten mit Mutationen, welche mit einer mTOR-Überaktivierung einhergehen, kann die genetische Diagnostik einen Einfluss auf das klinische Behandlungsregime haben. mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin und weitere Substanzen (sog. Rapaloge) sind zur Prävention von Organabstoßungen

nach Transplantationen zugelassen ⁸³. Im Sinne eines pharmakologischen Repurposing besteht seit 2010 für das Rapalog Everolimus eine Zulassung zur Behandlung des subependymalen Riesenzellastrozytoms bei TSC-Patienten ⁸⁴ und seit 2018 eine Zulassung für Epilepsien bei TSC ⁸⁵. Eine weitere Studie (STOP2 - NCT04595513) untersucht zurzeit den präventiven Einfluss von Everolimus auf epileptische Anfälle bei Kindern bis 6 Monaten mit TSC. Studien, welche den Einfluss von Rapalogen bei Patienten mit *DEPDC5*-Mutationen untersuchen, existieren bisher nicht. Diese könnten jedoch perspektivisch von Interesse sein, insbesondere da in den letzten Jahren zunehmend neue betroffene Familien identifiziert werden konnten. Weitere Studien richten sich auch auf die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen, wie zum Beispiel die direkte pharmakologische Inhibition von AKT ⁸⁶.

Bei nachgewiesener Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren in der klinischen Praxis besteht weiterhin Forschungsbedarf bei der Entwicklung wirksamer Stoffe mit optimiertem Nebenwirkungsprofil ⁸⁷⁻⁸⁹. Weiterführende Grundlagenforschung scheint daher notwendig, um den erfolgsversprechenden Ansatz der Präzisionsmedizin besser ausnutzen zu können.

1.6 Zielsetzung

Epileptische Anfälle entstehen durch die synchrone Übererregung von Nervenzellen. Ein geeignetes Zellmodell sollte daher den neuronalen Phänotypen nachbilden können. Die SH-SY5Y- Zelllinie, welche bisher überwiegend bei der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen (Parkinson, Alzheimer) Anwendung gefunden hat, soll in dieser Studie auf die Anwendbarkeit bei der Erforschung der Pathomechanismen von Epilepsien geprüft werden. Dies wird beispielhaft an dem Gen *DEPDC5* durchgeführt.

Damit leistet diese Studie einen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Pathologie von Epilepsien mit dem Ziel die Behandlung in Richtung einer individualisierten, besser wirksamen Therapie zu entwickeln.

Folgende Ziele wurden hierfür formuliert:

- 1) Generierung eines homozygoten *DEPDC5*-Knockouts in SH-SY5Y mittels CRISPR/Cas9 und Validierung des Knockouts auf a) DNA- b) RNA- und c) Proteinlevel.
- 2) Funktionelle Validierung des homozygoten *DEPDC5*-Knockouts durch Nachweis einer mTOR-Überaktivierung durch Western Blot.
- 3) Morphologische Validierung des homozygoten *DEPDC5*-Knockouts durch Nachweis vergrößerter Zellsomata und einer komplexeren neuronalen Architektur mittels Durchflusszytometrie (engl.: *Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) und Sholl-Analyse.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Die Identität der SH-SY5Y Zelllinie wurde durch Dr. Thomas Rothämel (Medizinische Hochschule Hannover Institut für Rechtsmedizin) mit dem *AmpF^lSTR Profiler* und dem *AmpF^lSTR NGM Select PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems) bestätigt.

Das Proliferationsmedium bestand aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ergänzt mit 10% Fetalem Kälber Serum (FCS), 1% Natriumpyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin (alle Life Technologies). Das Medium wurde jeden zweiten Tag vollständig gewechselt. Zur Proliferation wurden die Zellen in T75-Flaschen (Sarstedt) kultiviert. Zeigte sich der Boden einer T75-Flasche konfluent mit SH-SY5Y bewachsen, so wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich) für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf neue T75-Flaschen aufgeteilt.

Alle SH-SY5Y Kulturen wurden regelmäßig mittels Mykoplasmen-PCR (Minerva) auf Mykoplasmen getestet.

Das neuronale Differenzierungsmedium bestand aus Neurobasal®- A Medium ergänzt mit 1x GlutaMAX, 1x B-27 (alle Life Technologies), 10µM Retinsäure (Sigma Aldrich), 2mM Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP, Cayman Chemical Company), 50ng/ml Human brain derived neurothropic factor (hBDNF, Immunotools), 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) und 20mM Kalium-Chlorid (Sigma Aldrich). Die Zellen wurden für 11 Tage differenziert und das Medium jeden zweiten Tag gewechselt.

2.2 Transfektion

Die Elektroporation ist eine Methode, um DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen (Transfektion) und basiert auf einer kurzzeitigen Permeabilitätssteigerung der Zellmembran durch elektrischen Strom.

Diese Methode wurde an zwei verschiedenen Punkten dieser Arbeit genutzt. Zunächst wurden die CRISPR/Cas9-Plasmide für den DEPDC5-Knockout in SH-

SY5Y- Zellen transfiziert. Später, bei der Erfassung der neuronalen Differenzierung, wurden dann der pcDNA3 mCherry LIC cloning Vektor (Plasmid #30125, Addgene) in die bestätigten DEPDC5-Knockout-Klone bzw. Kontrollen transfiziert. Für den DEPDC5-Knockout durch CRISPR/Cas9 wurden je 2µg der Plasmide verwendet. Für die Fluoreszenzexperimente wurden 3,55µg des mCherry Vektors verwendet.

Alle Transfektionen wurden mit dem Nucleofector™ 2b Gerät (Lonza), den zugehörigen Küvetten sowie dem geeigneten Kit „Cell Line Nucleofector™ Kit V“ nach dem optimierten Protokoll des Herstellers für SH-SY5Y durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer manuell gezählt. Für jede Reaktion wurden $1,1 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 110µl Mastermix (Cell Line Nucleofector® Solution V (Lonza) und Supplement (Lonza); Verhältnis 4,5:1) und dem jeweiligen Plasmid resuspendiert. 100µl der Zellsuspension wurden in die vom Hersteller bereitgestellte Küvette gegeben, und die Elektroporation mit dem Programm A-023 durchgeführt. Direkt danach wurden 500µl Penicillin/Streptomycin-freies Proliferationsmedium hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 6-Well-Platte (Sarstedt) mit im Inkubator konditioniertem Penicillin/Streptomycin-freiem Proliferationsmedium überführt.

2.3 DEPDC5-Knockout

Um den Einfluss eines DEPDC5-Knockouts auf die neuronale Zellmorphologie zu untersuchen, nutzten wir die CRISPR/Cas9 Methode, um stabile Knockout-Zelllinien zu erzeugen. Dabei folgten wir dem Protokoll von Ran et al ⁹⁰.

2.3.1 sgRNA-Design

Mit Hilfe der Internetseite crispr.mit.edu (nicht mehr verfügbar) ⁹⁰ wurden drei *single-guiding RNAs* (sgRNA) für *DEPDC5* ausgewählt. Dieses Tool identifiziert mögliche Zielsequenzen und ordnet diese anhand der Wahrscheinlichkeit für Off-Target-Mutationen. Folgende 4 Regeln wurde bei dem Design beachtet:

1) Auf die potenziellen Off-Target-Sequenzen sollten keine 5'-NGG oder 5'-NAG PAM-Sequenz folgen.

2) Die potenziellen Off-Target-Sequenzen sollten eine möglichst geringe Übereinstimmung mit der On-Target-Sequenz aufweisen, d.h. sgRNA mit Off-Target-Sequenzen, die sich in weniger als 3 Nukleotiden unterscheiden, sollten vermieden werden.

3) Innerhalb der PAM-nahen- Region der potenziellen Off-Target-Sequenzen sollten sich mindestens 2 Nukleotide unterscheiden.

4) Die sich unterscheidenden Nukleotide sollten möglichst aufeinanderfolgen oder maximal 4 Basen auseinanderliegen.

Zusätzlich wurden die potenziellen Off-Targets der einzelnen sgRNAs von uns untersucht und sgRNAs wurden nicht verwendet, wenn sich Off-Targets in mit neuronaler Differenzierung assoziierten Genen befanden.

Um einen möglichst frühen Abbruch der Translation zu erzeugen, wurden zwei Zielsequenzen in Exon 2 und eine Zielsequenz in Exon 3 von *DEPDC5* ausgewählt. Zusätzlich wurden beide sgRNAs in Exon 2 so ausgewählt, dass sie sich in der Region des aus einer australischen Familie mit FFVEF bekannten, heterozygoten Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism (SNP)) c.21C>G (p.Tyr7*) befanden ³⁷.

2.3.2 Klonierung der sgRNA

Die Oligonukleotide für die sgRNAs wurden bei Sigma Aldrich bestellt und jeweils in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 - Plasmid kloniert (Plasmid #62988; Addgene). Die sgRNA wurden mittels Bbs1-Restriktionsverdau und T4 DNA Ligase (Thermo Fisher) in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 -Plasmid eingefügt. Die Plasmide wurden in den kompetenten *E. coli*-Stamm DH5 α (Invitrogen) transformiert und erfolgreich transformierte Bakterien wurden mittels Ampicillin (Carl Roth) selektiert. Abschließend wurde das Plasmid aus den *E. coli* isoliert und die erfolgreiche Insertion der sgRNA durch Sanger-Sequenzierung (Primer U6 und Lko1) bestätigt (s. Anhang).

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in SH-SY5Y Wildtypzellen transfiziert. Das Proliferationsmedium wurde 24h nach der Transfektion vollständig gewechselt. Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurden die Zellen ab dem darauffolgenden Tag für 11 Tage jeden zweiten Tag mit Proliferationsmedium ergänzt mit 750ng/ml Puromycin (Life Technologies) gefüttert.

2.3.3 Einzelzellselektion

Nach der Puromycinselektion wurden die Zellen für ca. 14 Tage mit Standard-Proliferationsmedium gefüttert. Die selektierten Einzelzellen proliferierten in dieser Zeit zu kleinen, unabhängigen Kolonien. Diese wurden mit 5µl Trypsin-EDTA (Life Technologies) abgelöst, in eine 96 Well- Schale transferiert und von dort expandiert. Wuchsen die Zellen in der Zellkulturschale konfluent, so wurden sie mit Trypsin-EDTA abgelöst und in das nächstgrößere Zellkulturschalenformat (in diesem Fall 24 Well-Format) überführt.

2.4 Knockout-Validierung auf DNA-, RNA- und Proteinebene

2.4.1 DNA-Sequenzierung

Zur Bestätigung des Knockouts auf DNA-Ebene wurde die DNA der SH-SY5Y-Zellen einer 6-Well-Schale (Sarstedt) mit dem *Masterpure DNA extraction kit* (Epicentre) nach der Anleitung des Herstellers extrahiert. Das Pellet wurde in Tris-EDTA (TE) gelöst und die Konzentration mit der *nanovolume application* des Photometers (Implen) bestimmt.

Die zu untersuchenden Genabschnitte wurden mittels spezifischer Primer (s. Anhang) im PCR-Thermocycler (Sensoquest) amplifiziert. Pro Probe wurde ein Ansatz aus 1µl DNA-Lösung (20ng/µl) und 24 µl Mastermix hergestellt. Der Mastermix bestand aus 1xONE Taq GC-Puffer (New England Biolabs), 80µM (Biozym), 0,2µl Taq-Polymerase (New England Biolabs), 400nM Vorwärtsprimer und 400nM Rückwärtsprimer (beide Sigma Aldrich) und wurde mit nucleasefreiem Wasser (Ambion, Life Technologies) auf 25µl aufgefüllt.

Für Exon 2 bestand das PCR-Programm aus: 30 sec bei 94°C gefolgt von 38 Zyklen à 20 sec bei 94°C, 20 sec bei 60°C und 45 sec bei 68 °C. Danach folgten 5 min bei 68°C. Für Exon 3 bestand das PCR-Programm aus: 30 sec bei 94°C gefolgt von 35 Zyklen à 20 sec bei 94°C, 20 sec bei 52 °C und 45 sec bei 68 °C. Danach folgten 5 min bei 68 °C. Die erfolgreiche Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnittes wurde auf einem Agarosegel bestätigt.

Das PCR-Produkt wurde mit dem *Nucleospin- PCR Clean up* (Macherey-Nagel), der Herstelleranleitung folgend, aufgereinigt. Die Proben wurden schließlich mittels des *TubeSeq-Service* der Firma EUROFINS Sanger-sequenziert (s. Anhang).

Es konnten insgesamt vier Zelllinien mit Indel-Mutationen und verfrühtem Stoppcodon identifiziert werden. Die Mutationen wurden mittels *mutationtaster.org* auf ein verfrühtes Stoppcodon untersucht.

2.4.2 Real-Time-RT-PCR

Zur Bestätigung des DEPDC5-Knockouts auf RNA-Ebene wurde die RNA der SH-SY5Y-Zellen mit dem *GeneJet RNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach der Anleitung des Herstellers extrahiert (einschließlich DNase Behandlung). Das Pellet wurde in TE gelöst und die Konzentration mit der *nanovolume application* eines Photometers (Implen) bestimmt. Die RNA wurde mittels des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific), den Herstellerangaben folgend, in cDNA umgeschrieben.

Die Real-Time-RT-PCR wurde unter Nutzung des *Universal Probe Library/UPL Systems* (human, probes #1-90, Roche) an einem *StepOne Plus* Gerät (Thermo Fischer) durchgeführt. Die pro Genort spezifischen Primer-Probe-Kombinationen (s. Anhang) wurden mit dem *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche geplant. Im Anschluss wurden die Primer mit Hilfe des *IDT Oligo Analyzer Tools* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) auf Haarnadelstrukturen (QC cutoff - $2 \leq \Delta G \leq 2$; $T_m < 40^\circ\text{C}$) und Homo- und Heterodimere ($\Delta G \geq -8$) geprüft und über Sigma Aldrich bestellt.

Zusätzlich zu *DEPDC5* wurden die RNA der *housekeeper*-Gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), β -Glucuronidase (*GUSB*), Beta-Aktin (*ACTB*) und DNA-Polymerase II (*POL2*) quantifiziert.

Pro PCR-Reaktion wurde in einer 96 Wellplatte (BioCentrix, Steinbrenner) 10ng cDNA, 1x Absolute QPCR Mix, ROX (Thermo Fisher Scientific), 200nM Vorwärtsprimer, 200nM Rückwärtsprimer (beide Sigma Aldrich), 100nM der jeweiligen UPL Probe (Roche) und Nuklease-freies Wasser (Ambion, Thermo Fisher) ad 20 μ l verwendet.

Jede Probe wurde in Triplikaten untersucht. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Das Realtime-RT-Protokoll bestand aus einmalig 2 min à 50°C und 2 min à 95°C. Danach folgten 40 Zyklen mit je 15 Sekunden à 95°C und 1 Minute à 60 °C. Die Auswertung erfolgte mit der *StepOne* Software v2.3 und *ExpressionSuite* Software (Applied Biosystems). Die statistische Auswertung erfolgte auf Grundlage der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode⁹¹ in Excel (Microsoft Corporation).

2.4.3 Western Blot

Zur Bestätigung des *DEPDC5*-Knockouts auf Protein-Ebene wurden Zellpellets aller Knockout-Zelllinien, sowie von Wildtyp und Leervektor-Kontrollen in 50-100 μ l RIPA – Puffer (50mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 2mM MgCl₂ (alle von AppliChem), 0,5% Sodium Deoxycholate (Sigma Aldrich), 0,1% SDS (AppliChem), 0,5-1 μ l/ml Universal Nuclease (Pierce) und 1 *proteinase inhibitor cocktail tablet* auf 10ml Puffer (cOmplete ULTRA Tablets Mini Easypack, Roche) resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 Minuten bei 4°C und 21.000g zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Eppi überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels des *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Life Technologies), den Herstellerangaben folgend, an einem *Multiscan FC 96-well plate reader* (Thermo Scientific) bei 562nm bestimmt. Das Volumen entsprechend 50 μ g Protein wurde mit 1x Ladepuffer (60mM Tris pH 6,8, 1% SDS (both AppliChem), 5% Glycerol, 0,01mg/ml Bromphenolblau (beide Carl Roth)) vermischt und mit Wasser auf 30 μ l aufgefüllt. Die Proteine wurden für 10 Minuten bei 70°C denaturiert, gefolgt von der Gel-Elektrophorese (Sammelgel bei 100V:

5% Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1; Serva), 0,1% SDS, 125mM Tris pH 6.8 (beide Applichem), 0,1% APS (Ammoniumperoxidsulfat) , 0,1% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan, beide Carl Roth); Trenngel bei 140V: 12% Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1; Serva) 0,1% SDS, 250mM Tris pH 8,8 (beide Applichem), 0,1% APS, 0,04% TEMED (beide Carl Roth)).

Anschließend wurden die Proteine bei $1\text{mA}/\text{cm}^2$ für 80 min auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-FL) übertragen (Western Blot Puffer: 125mM Tris, 1,25mM Glycin, 0,1% SDS (AppliChem) 20% Methanol (Fisher Chemical)).

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in iBind Flex Solution (Thermo Fisher) inkubiert ehe die Antikörper hinzugegeben wurden. Zunächst wurden die Primärantikörper (Anti-DEPDC5-Antikörper (1:1000 in iBind Flex Solution, rabbit, Abcam) und Anti-GAPDH-Antikörper (1:2500 in iBind Flex Solution, mouse, Santa Cruz)) aufgebracht, gefolgt von den Sekundärantikörpern (anti-rabbit IgG HRP conjugate (1:5000 in iBind Flex Solution, Santa Cruz) und anti-mouse IgG HRP conjugate (1:5000 in iBind Flex Solution, Santa Cruz)). Die Membranen wurden 3 Mal für jeweils 5 Minuten mit PBST (1xDPBS (Thermo Fisher), 0.1% Tween-20 (AppliChem)) gewaschen. Abschließend wurden die Proteinbanden mithilfe von einer Chemilumineszenzreaktion dargestellt (Pierce ECL Western Blotting Substrates (Thermo Fisher)). Hierbei katalysiert die am Sekundärantikörper befindliche Peroxidase die Reaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid, unter der Emission von Licht. Das Signal wurde an einem *Protein Simple FluorchemQ Imaging* System registriert.

Für die mTOR-Überaktivierungsexperimente wurden die Zellen geerntet und für 90 Minuten in vollständigem Proliferationsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem DPBS gesammelt, bei 500g für 5 Minuten zentrifugiert und in RIPA-Puffer lysiert. Die Immunoblots wurden entsprechend der oben genannten Anleitung durchgeführt. Als Primärantikörper wurden AKT (1:1000 in iBind Flex Solution, rabbit, Cell Signaling), Phospho-AKT (Ser473; 1:1000 in iBind Flex Solution, rabbit, Cell Signaling), S6 Ribosomal protein

(1:1000 in iBind Flex Solution, rabbit, Genetex) und Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244; 1:1000 in iBind Flex Solution, rabbit, Cell Signaling) verwendet. Es wurden die o.g. Sekundärantikörper in gleicher Konzentration verwendet.

2.5 Morphologische Analyse

Um den Einfluss eines DEPDC5-Knockouts auf die neuronale Zellmorphologie zu untersuchen, betrachteten wir zum einen die Zellgröße proliferierender SH-SY5Y-Zellen und zum anderen die neuronale Architektur differenzierender SH-SY5Y-Zellen.

2.5.1 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Zur Bestimmung der Zellgröße nutzten wir FACS. Das Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter) ist proportional zum Durchmesser der Zelle, d.h. je größer der Grad der Lichtablenkung desto größer ist der Durchmesser.

Proliferierende Wildtyp-, Knockout- und Leervektorzellen wurden mit Trypsin-EDTA abgelöst und gezählt. Das Volumen entsprechend 500.000 Zellen wurde in einem Reaktionsgefäß bei 500g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und erneut bei 500g für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 150µl FACS-buffer (Cell Wash (BD) und 0,5% Bovines Serumalbumin (Sigma Aldrich) und 0,01% NaN₃) aufgenommen und durch einen Cellstrainer in ein FACS-Tube gegeben. Die Messungen wurden an einem BD FACSCelesta durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit FCSalyser (Version 0.9.12).

2.5.2 Sholl-Analyse

Die Sholl-Analyse ist eine Methode, welche die Komplexität neuronaler Verästelungen beschreibt, indem größer werdende Kreise um das Zellsoma gezogen und die Schnittstellen mit den auswachsenden Neuriten bestimmt werden ⁹².

Die *in-vitro* Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen führt zu einem Geflecht aus sich überlagernden Neuriten. Für die Analyse der neuronalen Differenzierung auf Einzelzellniveau, ist es jedoch notwendig jedem Neuriten das zugehörige Soma eindeutig zuzuordnen zu können. Auf Grund dessen stellten wir eine Co-Kultur aus rot-fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen her und dokumentierten die neuronale Differenzierung der Einzelzellen unter fluoreszierendem Licht.

Knockout-, Wildtyp- und Leervektorzellen wurden mit dem pcDNA3 mCherry LIC cloning Vector (Plasmid #30125, Addgene) transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit PBS (Life Technologies) gewaschen und anschließend mit Proliferationsmedium gefüttert.

Zwei Tage nach der Transfektion mit dem mCherry-Vektor wurde zunächst das Verhältnis von mCherry-positiven und mCherry-negativen Zellen abgeschätzt. Eine Durchlicht- und eine Fluoreszenzaufnahme von dem gleichen Abschnitt der Zellkulturplatte wurde in ImageJ (Version V1.52p) (National Institutes of Health) mit dem Befehl „merge channels“ zusammengefügt. Mit Hilfe des Plugins „Cell counter“ wurde der Anteil an transfizierten, also rot fluoreszierenden, Zellen berechnet. Es wurden pro Konstrukt mindestens 100 Zellen gezählt.

Für jedes Konstrukt wurde eine Co-Kultur in einer 24-Well Platte (Sarstedt) aus mCherry-positiven und nicht mit mCherry transfizierten Zellen angelegt. Um die Überlagerung fluoreszierender Zellen möglichst zu vermeiden, betrug der Anteil mCherry-positiver Zellen in der Co-Kultur 25%. Eine Ausnahme stellte Konstrukt 2.2.4 dar. Hier betrug die Transfektionsrate nur 17 %, sodass die Zellen ohne Co-Kultur ausgesät wurden.

Nach 6,5h wurde das Proliferationsmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht. Danach wurden die Zellen jeden zweiten Tag mit frischem Differenzierungsmedium gefüttert. Nach 11 Tagen wurde die Differenzierung aller Konstrukte mit einem AE31 Fluoreszenzmikroskop (Motic) dokumentiert.

Mit ImageJ wurde ein Binärbild der Zellen erstellt (s. Anhang). War eine Zelle zu groß, um mit einer Aufnahme vollständig dargestellt zu werden, so wurden mehrere Aufnahmen angefertigt. Die einzelnen Aufnahmen einer Zelle wurden dann mit Photoshop (Adobe) zusammengefügt, in ImageJ kalibriert und in ein Binärbild umgewandelt. Ergab sich durch den Verarbeitungsprozess in ImageJ

ein Unterschied zwischen dem Binärbild und dem Original (z.B. eine unvollständige Darstellung eines Neuriten), so wurde dies mit der Stiff-Funktion in ImageJ korrigiert.

Abschließend erfolgt die Sholl-Analyse der Binärbilder in ImageJ. Das Zentrum des Zellsomas wurde manuell markiert und die Funktion „Sholl“ in ImageJ ausgeführt (s. Anhang; Manual: <https://imagej.net/plugins/sholl-analysis>).

Mittels der Shollanalyse wurden folgende Parameter erhoben:

Tabelle 3 Sholl-Analyse: Erhobene Parameter

Englischer Titel	Deutsche Übersetzung	Bedeutung
Intersecting radii	Schneidende Radien	Anzahl der gemessenen Kreise, die den Neuritenbaum mindestens einmal schneiden
Sum of intersections (<i>Sum inters.</i>)	Anzahl der Schnittstellen	Anzahl an allen gemessenen Schnittstellen mit allen Radien
Mean of intersections (<i>Mean inters.</i>)	Durchschnitt der Schnittstellen	Anzahl der Schnittstellen geteilt durch die Anzahl der schneidenden Kreise
Median of intersections (<i>Median inters.</i>)	Median der Schnittstellen	Der Median der Anzahl der gemessenen Schnittstellen
Highest count of intersections (<i>Max inters.</i>)	Höchste Anzahl an Schnittstellen	Der höchste Wert an Schnittstellen, der an irgendeinem Radius gemessen wurde
Radius of highest count of intersections	Radius, mit der höchsten Anzahl an Schnittstellen	Radius, an dem die höchste Anzahl an Schnittstellen gemessen wurde

<i>(Max inters. radius)</i>		
Enclosing radius	Umschließender Radius	Der letzte schneidende Radius

Die Binarisierung und die Shollanalyse liefen für den Auswertenden verblindet ab.

2.6 Statistische Methoden

Alle Analysen wurden in R (Version 1.2.1335) durchgeführt.

Die Gruppenunterschiede der Morphologischen Analyse wurden mittels pairwise t-Test getestet und wurden mit der Holm- Bonferroni-Methode für multiples Testen korrigiert. Das Ergebnis galt als signifikant, wenn der korrigierte p-Wert < 0,05 betrug.

Die Verteilung der Zellgrößenmessungen wurde mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Übereinstimmung geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 CRISPR/Cas9 induziert DEPDC5-Knockout

Um die Rolle von DEPDC5 in neuronalen Zelllinien zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt mittels CRISPR/Cas9 ein Knockout in die SH-SY5Y-Zelllinien eingefügt. Insgesamt konnten vier DEPDC5-KO-SH-SY5Y-Zelllinien mit homozygoten Indel-Mutationen und vorzeitigem Stoppcodon hergestellt und validiert werden (Abbildung 2). Mittels sgRNA 2.2 wurde in zwei unabhängigen Einzellzellkolonien ein Cytosin deletiert, was zu einem vorzeitigen Stopp an Position 69 führte (im Folgenden als KO(2.2.1) und KO(2.2.2) bezeichnet). Mittels sgRNA 3 wurde zum einen ein Guanin eingefügt, was zu einem Stoppcodon an Position 141 führte (KO(3.1)) und zum anderen 47 Basen deletiert, was zu einem Stoppcodon an Position 93 führte (KO(3.2)). Für alle diese Mutationen konnte in-silico mittels „mutation t@ster“ (<http://www.mutationtaster.org>)⁹³ ein verfrühtes Stoppcodon in Exon 3 gezeigt werden (Tabelle 4). In den Ansätzen mit sgRNA 2.1 konnte keine homozygote Indel-Mutation mit Leserasterverschiebung gefunden werden. Lediglich eine homozygote Deletion eines Basentriplets konnte nachgewiesen werden. Zudem zeigte die Sequenzierung mehrerer Einzelklone/Kolonien übereinanderliegende Basenpaarpeaks, welche typischerweise durch ein Zellgemisch (mit mindestens einer mutierten Zellreihe) oder einen heterozygoten DEPDC5-Knockout erklärt werden können. Die Sequenzierung der Kontrollen (Leer(1) und Leer(2)) zeigte keine Mutationen (Abbildung 2). Für die 3 getesteten sgRNAs ließ sich daher zusammenfassen, dass mittels CRISPR/Cas9 das Genom modifiziert werden konnte. Für alle weiteren Experimente wurden die Zelllinien KO(2.2.1), KO(2.2.2), KO(3.1), KO(3.2) genutzt, da diese über eine validierte homozygote Nonsense-Mutation verfügten. Um Off-Target-Effekte auszuschließen, prüften wir die Spezifität der sgRNAs mit dem Tool CRISPOR⁹⁴. Hier zeigte sich für alle sgRNAs, entsprechend den Empfehlungen, ein „MIT-specificity-score“ von größer 50 (Tabelle 5).

Tabelle 4 Prüfung auf vorzeitiges Stopcodon; blau: mutierte Aminosäuresequenz

	Wildtyp	KO 2.2.1/ KO (2.2.2)	KO (3.1)	KO (3.2)
Art der Mutation		Deletion	Insertion	Deletion
DNA-Veränderung		c.11_11del C	c.84_85insG	c.78_124delC C..TG
Position des Stopcodons in der codierenden DNA-Sequenz	4512	69	141	93
Exon des Stopcodons	Exon 39	Exon 3	Exon 3	Exon 3
Position des Stopcodons in der cDNA	4590	147	219	171
Position der ersten veränderten Aminosäure		4	29	27
Aminosäuresequenz	MRTTKVYKLV HKKGFGGSDDE LVVNPkVFP LGDIVEIAHPN DEYSPLLLQVKS LKE...	MRT KRST NSSTRRAL GAVMMS *	MRTTKVYKL VIHKKGFGG SDELVVNP KGVPSHQA WRHCRCTP QR*	MRTTKVYKL VIHKKGFGGS DDELVVNT P QR*
RefSeq: NM_001242897				

Tabelle 5 Off-Target-Analyse

Guiding-RNA	MIT-specificity-score
sgRNA Ex2.1	75
sgRNA Ex2.2	60
sgRNA Ex3	72

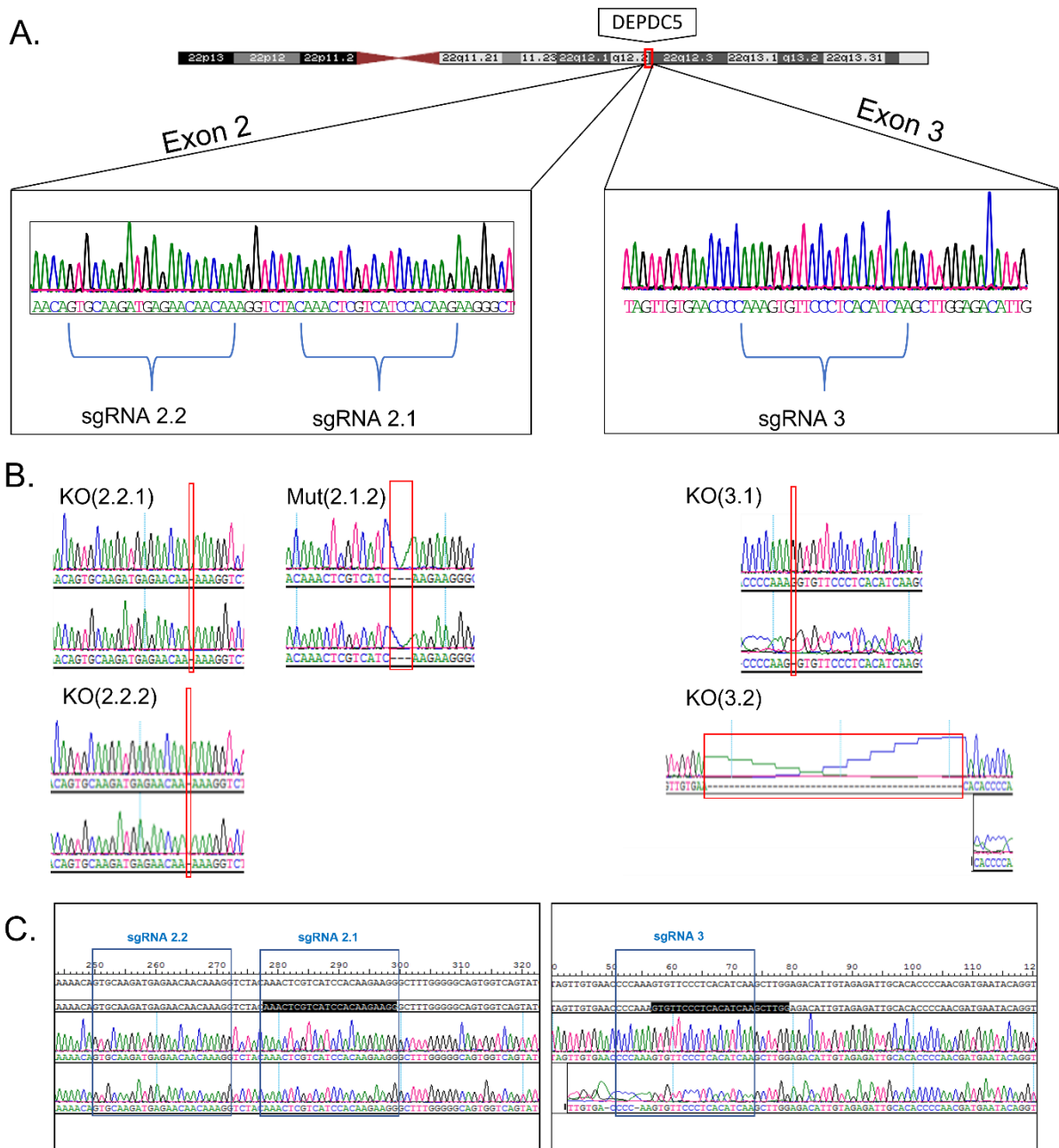
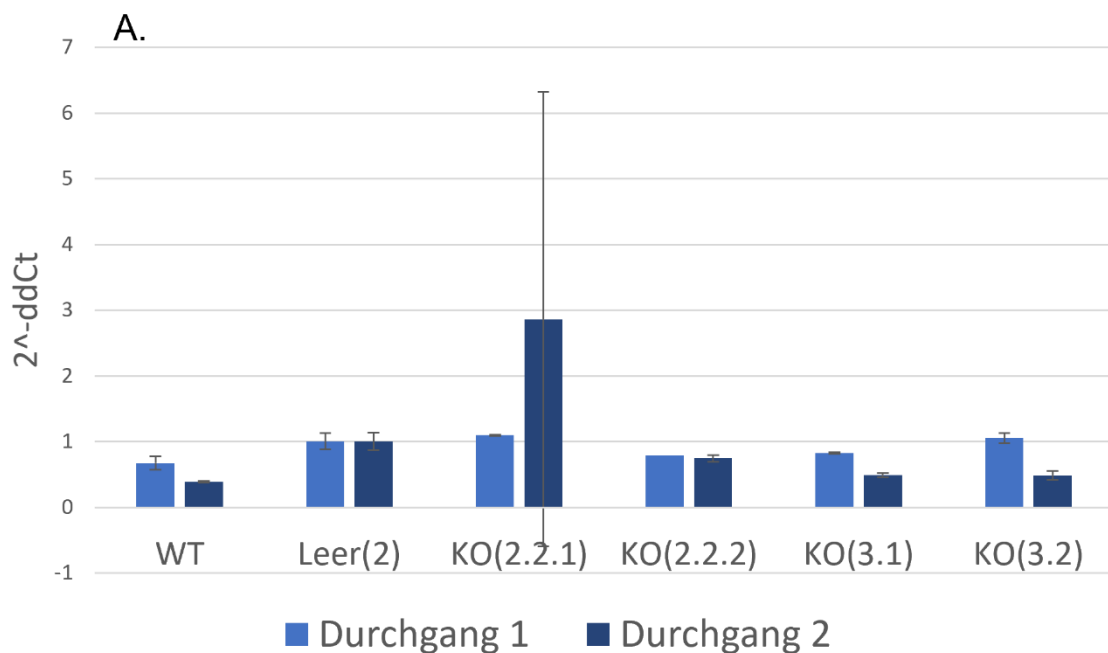


Abbildung 2 CRISPR-Cas9 Design und Ergebnisse der Sangersequenzierung

- A) sgRNA-Design in Exon 2 und Exon 3 von DEPDC5
- B) Sanger-Sequenzierungsergebnisse der Einzelzellkolonien (oben: vorwärts, unten: rückwärts). Die rote Markierung kennzeichnet die Mutation. Für sgRNA 2.1. konnte lediglich eine Deletion von 3 Basen identifiziert werden (Mut(2.1.2.)), welche nicht für die folgenden Experimente eingesetzt wurde.
- C) Der Leervektor zeigt unveränderte Wildtyp-DNA in Exon 2 (links) und Exon 3 (rechts).

3.2 Validierung des Knockouts auf RNA- und Proteinebene

Um auszuschließen, dass trotz der bestätigten Nonsense-Mutationen weiter RNA und Protein produziert werden, wurden alle DEPDC5-KO-SH-SY5Y auf RNA-Ebene mittels real-time-RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft. Für alle KO und Kontrollen zeigte sich keine signifikante Veränderung der RNA-Menge. Gleichwohl konnte die Abwesenheit des Proteins im Western Blot für alle KO gezeigt werden. Daher konnte für die folgenden Experimente von einem vollständigen Knockout ausgegangen werden (Abbildung 3).



B.

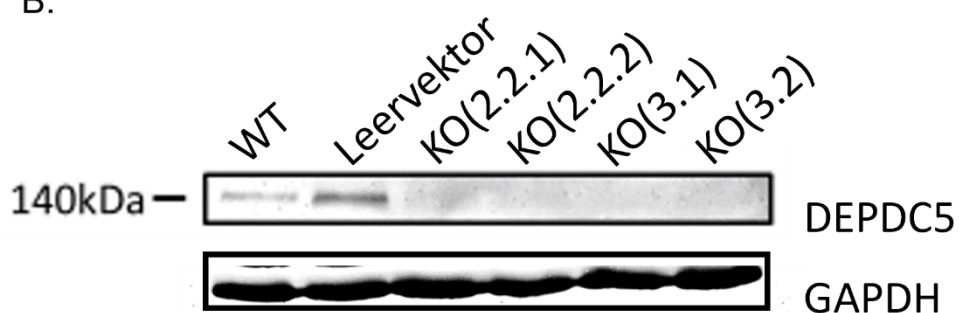


Abbildung 3 Validierung DEPDC5-KO auf RNA- und Protein-Ebene

- A) Die real-time-RT-PCR zeigte in keinem der 4 KO eine signifikante Reduktion ($p > 0,5$) von DEPDC5-mRNA. Die Analysen wurden als technisches Triplikat und biologischem Replikat durchgeführt. Die Fehlerindikatoren zeigen eine Standardabweichung an.
- B) Deskriptiv konnte die Abwesenheit des Proteins für alle 4 Zelllinien mittels Western Blot bestätigt werden. GAPDH ist hierbei die Ladekontrolle.

3.3 DEPDC-5-Knockout zeigt mTOR-Überaktivierung

Um zu überprüfen, ob der DEPDC-5-Knockout zu einer mTOR-Überaktivierung führt, wurde der Phosphorylierungsgrad von rpS6 (pS6) und AKT (pAKT) in proliferierenden SH-SY5Y mittels Western Blot bestimmt. Die anzunehmende vermehrte Phosphorylierung von rpS6, welche durch die Überaktivierung des mTOR-Signalweges ausgelöst wird, konnte für KO(2.2.2) und KO(3.1) gezeigt werden. Als zweiter Parameter wurde die reduzierte Phosphorylierung von AKT untersucht, welche durch eine Rückkopplungsschleife bei einer mTOR-Überaktivierung entsteht. Diese konnte für alle vier KO in diesem Experiment gezeigt werden (Abbildung 4).

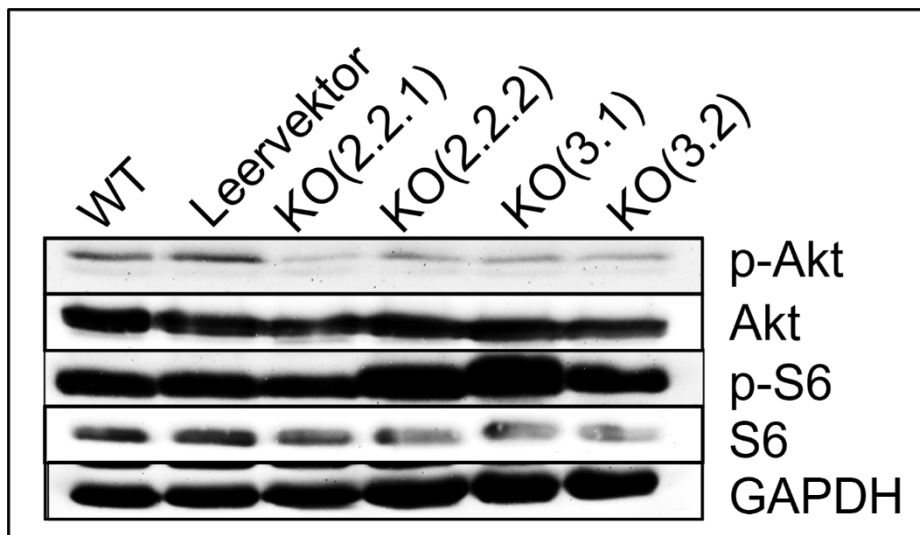


Abbildung 4 Prüfung auf mTOR-Überaktivierung

Western Blot für mTOR-Überaktivierungsmarker im nicht-phosphoryliertem (S6 und AKT) und im phosphoryliertem (pS6 und pAKT) Zustand. GAPDH als Haushaltsgen. Der Western Blot zeigt für alle KO ein reduziertes Signal für pAKT im Vergleich zum WT.

3.4 Morphologische Validierung des DEPDC5-Knockouts

mTOR ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums⁵⁵. Eine mTOR-Aktivierung führt im humanen Zellmodell zu einer Vergrößerung der Zellgröße und einer gesteigerten neuronalen Arborisierung^{66,95}. Um den Einfluss einer mTOR-Überaktivierung in SH-SY5Y zu untersuchen, wurde zum einen die Zellgröße proliferierender SH-SY5Y und zum anderen die neuronale Arborisierung von SH-SY5Y nach 11-tägiger Differenzierung bestimmt.

3.4.1 Zellgrößenbestimmung

Der Zusammenhang zwischen mTOR-Überaktivierung und Zellgröße wurden für alle KO mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierfür wurde die Veränderung des forward-scatters zwischen dem Leervektor und den DEPDC5-KO bestimmt (Abbildung 5). KO(2.2.2) ($p=0,005$), KO(3.1) ($p<0.001$) und KO(3.2) ($p<0.001$) zeigten eine signifikante Vergrößerung des Zelldurchmessers im Vergleich zum Leervektor. Für KO(2.2.1) zeigte sich eine relative Reduktion des Zelldurchmessers ($p<0.001$) (Abbildung 5).

3.4.2 Neuronale Differenzierung

Mittels der Sholl-Analyse wurden alle KO auf eine Veränderung der neuronalen Morphologie untersucht (Abbildung 6). Der umschließende Radius war für KO(2.2.1) und KO(3.1) signifikant größer (vs. Leer1: KO(2.2.1): $p=0,005$; KO(3.1) $p<0,001$), was für längeres Auswachsen der Neuriten spricht. Ebenso zeigte sich für KO(2.2.1) und KO(3.1) eine signifikante Zunahme der absoluten Anzahl an Schnittstellen zwischen den Neuriten und den Sholl-Radii (vs. Leer1: KO(2.2.1): $p=0,01$; KO(3.1) $p<0,001$). Um zu unterscheiden, ob die Zunahme an Schnittstellen durch ein längeres Auswachsen weniger Neuriten, oder durch eine Zunahme an Verästelungen zurückzuführen ist, bestimmten wir die durchschnittliche Anzahl an Schnittstellen zwischen einem Sholl-Radius und dem Neuritenbaum. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, sodass von einer Zunahme der Neuritenlänge, bei unveränderter Verästelung auszugehen ist. Für KO(2.2.2) und KO(3.2) ergaben sich für die erhobenen

Parameter keine signifikanten Unterschieden zu den Kontrollen (vs. Leer1: KO(2.2.2) $p=1$ und KO(3.2) $p=1$).

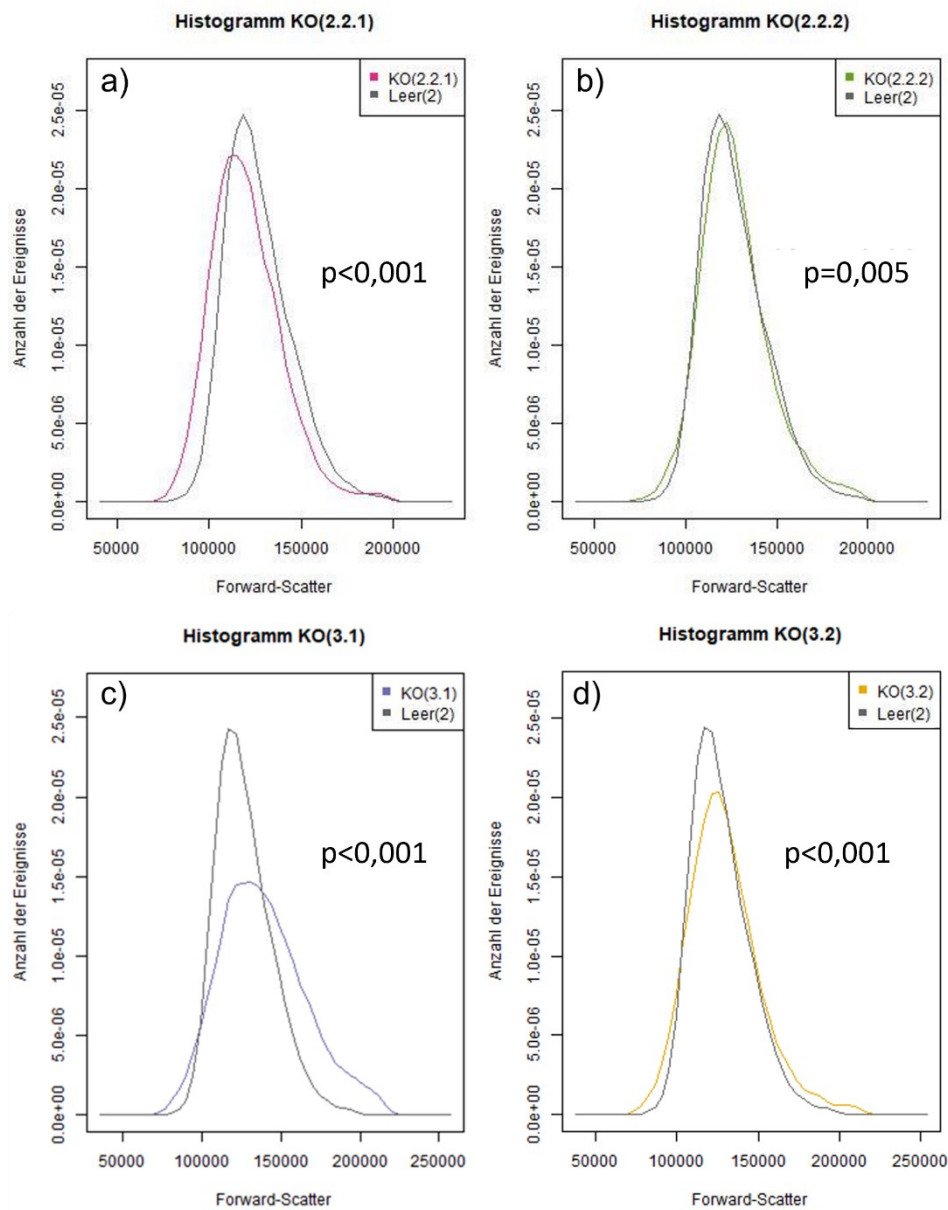


Abbildung 5 Zellgrößenbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Einzelne Histogramme für jeden KO (a-d) und Prüfung auf Übereinstimmung mittels Kolmogorow-Smirnow-Test. Der Forward-Scatter (x-Achse) ist proportional zu Zellgröße. Das Ergebnis galt als signifikant bei $p < 0,05$.

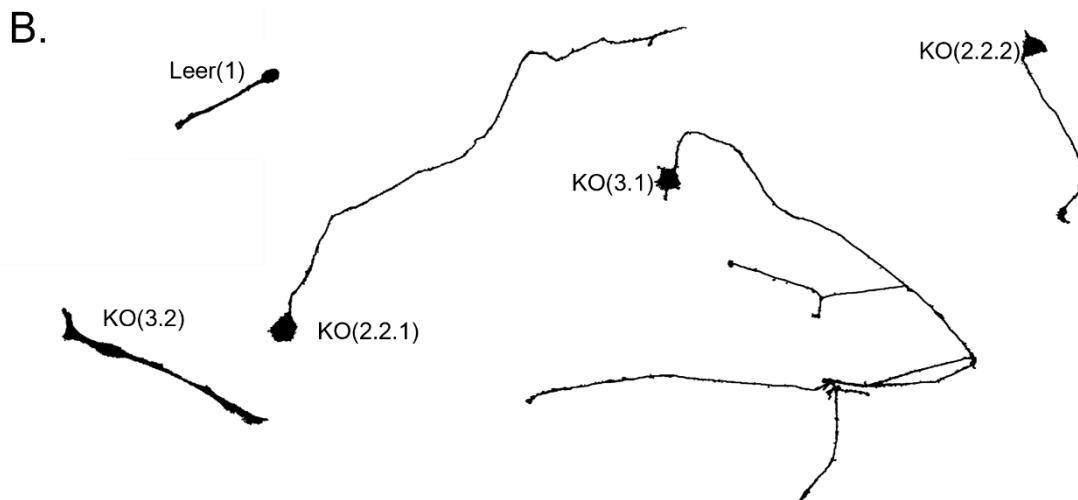
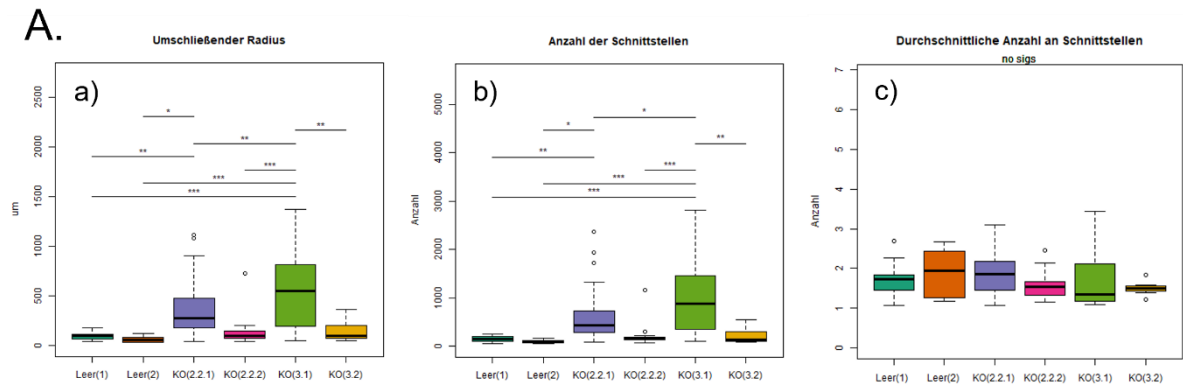


Abbildung 6 Neuronale Differenzierung

A) a) KO(2.2.1) und KO(3.1) zeigen im Vergleich zu Leer(1) und Leer(2) einen vergrößerten umschließenden Radius, was einem verlängerten Auswachsen der Neuriten entspricht. b) Das längere Auswachsen führt zu einer Zunahme der gesamten Anzahl an Schnittstellen im Vergleich zu Leer(1) und Leer(2) c) Die durchschnittliche Anzahl an Schnittstellen pro Sholl-Radius zeigt keine signifikanten Unterschiede. Es werden nur die signifikanten Unterschiede angezeigt. Die Fehlerindikatoren zeigen eine Standardabweichung an. *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

B) Exemplarisch ausgewählte binäre Bildaufnahmen der differenzierten SH-SY5Y, welche anschließend mittels der Sholl-Analyse ausgewertet wurden.

4 Diskussion

4.1 CRISPR/Cas9 ist eine geeignete Methode zur Genom-Editierung in SH-SY5Y

Die CRISPR/Cas9-Methode hat sich in den letzten Jahren auf Grund der guten Planbarkeit, der einfachen Herstellung der sgRNA und der spezifischen Nukleaseaktivität als führende Methode zur Genom-Editierung etabliert ⁹⁶. In vielfältigen Forschungsbereichen wurde diese Knockout-Methode bereits in SH-SY5Y angewandt, so z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Huntington-Erkrankung ⁹⁷, Alzheimer ⁹⁸, Parkinson ⁹⁹, oder auch bei Autismus ^{100,101}. Der durch die Nuklease Cas9 herbeigeführte Doppelstrangbruch, kann auf zwei verschiedene Arten mittels zelleigener DNA-Reparatur-Mechanismen korrigiert werden. Erstens durch *homology-directed repair* (HDR), bei dem zusätzlich zum CRISPR/Cas9-Konstrukt eine Reparaturvorlage, beispielsweise in Form eines Einzel-DNA-Stranges hinzugegeben wird. Dies ermöglicht das gezielte Einfügen einer definierten Mutation in das Genom. Zweitens durch *nonhomologous end joining* (NEJ). Hier wird der Strangbruch ohne Vorlage repariert, sodass es gehäuft zu Indel-Mutationen kommt ⁹⁰. In dieser Arbeit wurden die CRISPR/Cas9-Konstrukte ohne Reparaturvorlage transfiziert, sodass die Doppelstrangbrüche mittels NEJ repariert wurden. Da diese Arbeit den Einfluss eines vollständigen Knockouts, ohne Fragestellung bezüglich einer bestimmten Mutation, untersucht, stellte dies, auch auf Grund der einfacheren Handhabbarkeit, die Methode der Wahl dar.

Alle hier in dieser Arbeit verwendeten sgRNAs verfügten über einen *MIT-specificity-score* von mindestens 60, sodass das Risiko für Off-Target-Mutationen als niedrig einzuschätzen ist. Gleichwohl können auch unter Beachtung des *MIT-specificity-score* Off-Target-Mutationen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch sollte beachtet werden, dass der weit größte Teil der Off-target Mutationen nicht-protein-codierende Abschnitte der DNA betrifft ¹⁰². Mittels gezielter Sequenzierungen der potenziellen Off-Target-Sequenzen könnte die Möglichkeit von Off-Target-Effekten weiter minimiert werden. Dies würde nach den Empfehlungen von Concordet und Haussler 55 separaten Sequenzierungen für sgRNA(Ex.2.2) und 39 separaten Sequenzierungen für sgRNA(Ex. 3) entsprechen.

4.2 DEPDC5-KO-SH-SY5Y zeigen keine Reduktion an DEPDC5-mRNA

Es konnten auf DNA-Ebene für vier Einzelzellkolonien homozygote Nonsense-Mutationen für *DEPDC5* identifiziert und das Fehlen des Proteins im Western Blot bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurde in allen KO-Zelllinien ein unverändertes mRNA-Level nachgewiesen. Für *DEPDC5* konnte in humanen Lymphoblasten für Nonsense-Mutationen in Exon 21 und 32 gezeigt werden, dass der Abbau der mRNA durch *nonsense-mediated decay* (NMD) stattfindet¹⁰³ und auch in iPSCs führt ein DEPDC5-Knockout zu einer mRNA-Reduktion⁷². NMD verhindert die Entstehung von verkürzten und möglicherweise in ihrer Funktion veränderten Proteinen. Beobachtungen legen jedoch nahe, dass ein zu nah am Startcodon befindliches Stoppcodon keinen NMD initiiert. Wird beispielsweise ein verfrühtes Stoppcodon innerhalb der ersten 25 bp in das β -Globulin-Gen eingefügt, so entzieht es sich dem NMD¹⁰⁴. Dies könnte auch für die DEPDC5-KO in dieser Studie zutreffend sein, da sich die vorzeitigen Stoppcodons in Exon 3 und somit, relativ gesehen zur Gesamtlänge der DEPDC5-mRNA, weit vorne befanden. Passend zu dieser Beobachtung zeigten *depdc5*^{-/-} Mäuse mit Nonsense-Mutation in Exon 2 unveränderte RNA-Transkript-Niveaus im Vergleich zu Wildtypmäusen⁶². Dagegen zeigten *depdc5*^{-/-} Mäuse mit Nonsense-Mutation in Exon 5 eine Reduktion der mRNA⁶³. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise die frühe Position der Mutation in der codierenden DNA kein NMD auslöst. Schlussendlich konnte aber für die folgenden Experimente von einem vollständigen Knockout ausgegangen werden, da das Fehlen des DEPDC5-Proteins im Western Blot bestätigt wurde und die funktionelle Konsequenz daraus ersichtlich wurde.

4.3 DEPDC5-KO-SH-SY5Y zeigen verlässlich mTOR-Überaktivierung

Für alle vier DEPDC5-KO-Zelllinien konnte mittels Western Blot eine mTOR-Überaktivierung nachgewiesen werden. Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von S6 und AKT als Nachweis einer mTOR-Hyperaktivierung stellt für viele mTORopathien eine etablierte Methode dar. Neben Mutationen in DEPDC5 gilt dies auch für Mutationen in TSC1/2 und in

PTEN^{105,106}, welche beide ebenso klassische mTORopathien darstellen⁴¹. Auch in den hier verwendeten SH-SY5Y Zellen konnte die Bestimmung für AKT^{107,108} und S6¹⁰⁹ erfolgreich etabliert werden. Als konsistentester Parameter für die mTOR-Überaktivierung erwies sich in dieser Studie die reduzierte Phosphorylierung von AKT. AKT ist Teil eines negativen Feedbackloops des mTOR-Signalweges, welcher im physiologischen Zustand, z.B. bei chronischer Insulinexposition, die mTOR-Aktivität inhibiert. Die Reduktion der Phosphorylierung von AKT lässt auf eine mTOR-Überaktivierung schließen⁵⁸. Die erhöhte Phosphorylierung von S6 ließ sich deskriptiv nicht in allen Zelllinien zeigen. Auch Hughes et. al identifizierten in ihrem Mausmodell pAKT als konsistentesten Parameter, indem solche DEPDC-KO-Mäuse, die keine pS6-Überaktivierung zeigten, weiterhin verlässlich eine pAKT-Reduktion aufwiesen. Möglicherweise wird über diesen Feedback-Mechanismus die mTOR-Überaktivierung abgeschwächt, was auch den milderen Phänotyp im Vergleich zu TSC-KO-Modellen und auch beim Menschen erklären könnte⁶².

4.4 Einfluss des DEPDC5-KO auf die Zellgröße

Die Zunahme der Zellgröße gehört zu den am besten etablierten Phänotypen einer mTOR-Überaktivierung. Auch die Messung der Zellgröße mittels FACS stellt bei der Erforschung von DEPDC5-Mutationen bereits eine etablierte Methode dar. So konnten im neuronalen Mausmodell und an humanen HEK-Zellen mittels FACS ein vergrößerter Zelldurchmesser gezeigt werden⁶⁰. Das Zellwachstum erfordert die Zunahme an anabolen Prozessen, wie die Synthese von Proteinen, Lipiden und Nukleotiden, bei gleichzeitiger Hemmung kataboler Prozesse⁴⁴. Auf molekularer Ebene führt die Aktivierung von mTOR zur Phosphorylierung von p70S6 Kinase 1-Komplex (S6K1), welcher gemeinsam mit eIF4E Binding Protein (4EBP), die 5' Cap-Struktur abhängige mRNA-Translation fördert^{110,111}. Zusätzlich wird S6K1-vermittelt die Nukleotid-, Ribosomen-, Protein- und Lipidsynthese verstärkt¹¹²⁻¹¹⁴. S6K1-unabhängig führt darüber hinaus die mTOR-Aktivierung zu einer Hemmung der Autophagie^{115,116}. S6 und AKT stellen beide downstream-Enzyme von S6K1 dar, sodass wir vermuten, dass die beobachteten Veränderungen der Zellgröße über S6K1 vermittelt

wurden. Die möglichen Pathomechanismen für die verkleinerte Zellgröße von KO(2.2.1) werden im Absatz 4.6 weiter diskutiert.

4.5 Einfluss des DEPDC5-KO auf die neuronale Struktur

Die Neurogenese folgt einem eng abgestimmten Ablauf aus Zellteilung, Zellmigration, Zelldifferenzierung und Bildung von Synapsen. Diese Zellreifung wird durch vielfältige extrinsische und intrinsische Signale gesteuert, von denen viele im mTOR-Signalweg zusammenlaufen ^{117,118}. Die Tatsache, dass der Beginn der neuronalen Differenzierung mTOR abhängig ist, unterstreicht dessen wichtige Rolle ¹¹⁹. SH-SY5Y stellen frühe kortikale Entwicklungsstufen dar ⁷⁷, sodass wir vermuteten, dass ihre Differenzierung durch die mTOR-Überaktivierung positiv beeinflusst wird. Unsere Ergebnisse zeigten einen Trend auf, bestehend aus dem längeren Auswachsen der Neuriten, bei gleichbleibender Anzahl an Verästelungen. Im Vergleich zu den bisherigen Studien stellte dies einen neuen Befund dar. Die vorhandenen Studien, welche alle am Mausmodell durchgeführt wurden, zeigten allesamt eine Zunahme an Verästelungen ^{60-62,65,66}. In zwei dieser Studien wurde auch die Sholl-Analyse zur Beschreibung der neuronalen Architektur angewandt. Ribierre et al. beschrieben eine Zunahme an Verästelungen (=Shollintersections) über die ganze Länge des Neurons ⁶¹, während De Fusco et al. eine signifikante Zunahme der Shollintersections nur zwischen 90 und 110 µm des Neurons zeigen konnten ⁶⁶. Wir vermuten daher, dass die Verlängerung der Neuriten, ohne eine Zunahme der Komplexität eine individuelle Eigenschaft der DEPDC5-KO-SH-SY5Y im Vergleich zu den bestehenden murinen Zellmodellen ist. Möglicherweise stellt die frühe kortikale Entwicklungsstufe der SH-SY5Y den Grund hierfür dar. Beispielsweise fehlen SH-SY5Y die Fähigkeit zur Ausbildung von funktionierenden Synapsen, was eine wichtige Voraussetzung für Entwicklung von komplexen neuronalen Netzwerken darstellt ⁷⁷. Die zeitliche Abhängigkeit des Einflusses der mTOR-Aktivität auf die neuronale Differenzierung zeigte auch eine Studie an murinen hippocampalen Neuronen, bei denen der positive Einfluss einer mTOR-Überaktivierung auf die neuronale Komplexität in späteren Entwicklungsstufen verloren ging ¹²⁰. Hierzu passt auch eine weitere Studie, in der murine heterozygote *depdc5*-knockout-Neurone nur milde phänotypische

Veränderungen aufwiesen, während solche Neurone mit einem akuten shRNA-vermittelten *depdc5*-knockdown mit vergleichbarer Reduktion der Gendosis (40-50% der Gesamt- *depdc5*-mRNA), einen ausgeprägteren Phänotyp zeigten ⁶⁶. Weitere Forschung scheint hier notwendig, um den Zusammenhang zwischen Gendosis und zeitlichen Dynamiken besser verstehen zu können.

Die beobachteten neuromorphologischen Veränderungen lassen sich auf molekularer Ebene durch den Einfluss von mTOR auf vielfältige Prozesse erklären. mTOR ist notwendig für die Netrin-1 induzierte lokale Translation in axonalen Wachstumskegeln ¹²¹. Daneben vermittelt mTOR die lokale Translation von TAU und CRMP2-Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der neuronalen Polarität spielen ¹²² und mTOR fördert über das cytoplasmic linker protein of 170 kDa (CLIP-170) direkt die Bildung neuer Dendriten ¹²³.

4.6 Erklärungsansätze für Unterschiede in der neuronalen Morphologie

Morphologische Untersuchungen an *human neural progenitor cells* (hNPC) mit einem *DEPDC5*-KO zeigten, konträr zu den meisten Studien, eine reduzierte Zellgröße und eine reduzierte Dendritenlänge, bei bestätigter mTOR-Überaktivierung im Western Blot ¹²⁴. Der Einfluss gegenregulatorischer Mechanismen, um die mTOR-Überaktivierung auszugleichen, wurde als ursächlich vermutet. Auf der Ebene der Transkription zeigte die Studie von Jones et. al und eine weitere Studie von Torrence et al. beispielsweise die Runterregulation von Aminosäuretransportern. Die daraus resultierende erniedrigte intrazelluläre Aminosäurekonzentration könnte zu einer Hemmung von mTOR führen¹²⁵. Auch auf Proteinebene sind für den mTOR-Signalweg vielfache negative Feedback-Schleifen bekannt ¹²⁶. Ein Abschwächen der Überaktivierung von pS6 durch Feedback-Schleifen im *depdc5*-KO wurde beispielsweise von Hughes et al. auch für Mausmodelle vermutet ⁶². Diese Effekte könnten möglicherweise durch den Einsatz von RA und BDNF zur Differenzierung der SH-SY5Y weiter verstärkt worden sein. Für beide Stoffe ist bekannt, dass sie die neuronale Differenzierung über den Phosphatidylinositol 3-Kinase(Pi3P3)/Akt/mTOR-Signalweg vermitteln. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Pi3P3-Kinase/Akt-Signalweg wesentlich für die neuronale

Differenzierung mit RA in SH-SY5Y ist ¹²⁷. RA bindet an nukleäre Rezeptoren und führt dort zu einer Zunahme der Transkription von receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1), welcher den Pi3P-Akt-mTOR-Signalweg aktiviert ^{128,129}. BDNF bindet an den extrazellulären Tyrosin-Rezeptor-Kinase-B, worüber auch hier die mTOR-Aktivität gesteigert wird ¹³⁰⁻¹³². Phänotyp-Genotyp-Korrelationsstudien haben gezeigt, dass sich die klinischen Symptome neuronaler Entwicklungsstörungen trotz der sich überlappenden genetischen Ätiologie deutlich unterscheiden können. Als ein Grund wird hier das Zusammenkommen mehrerer Mutationen in wenigen konservierten Signalwegen (u.a. mTOR-Signalweg) vermutet ¹³³. Eventuell haben auch in dieser Studie die unterschiedlichen Einflüsse aus pharmakologischer und DEPDC5-KO-assoziiierter mTOR-Aktivität einhergehend mit vielfältigen Rückkopplungsmechanismen zu Unterschieden in der neuronalen Morphologie geführt ⁵⁵.

4.7 Vergleich des SH-SY5Y-Modells mit alternativen Versuchsmodellen

Vielfältige Tier- und Zellmodelle haben in den letzten Jahrzehnten Anwendung in der Epilepsieforschung gefunden ^{134,135}. Dabei kann jedes Modell, abhängig von der Forschungsfrage, immer nur Teilaspekte der zerebralen Pathophysiologie darstellen. Bei der Entscheidung für das passende Modell können folgende Kriterien von Dolmetsch und Geschwind helfen ¹³⁶: i) Relevanz für den Menschen (Wie genau stellt das Modell die in-vivo Pathologie nach?), ii) Einblick in Pathomechanismen (Können die relevanten Pathomechanismen in dem Modell untersucht werden?), iii) Durchsatz (Kann eine ausreichende Menge an Zellen untersucht werden, um signifikante Ergebnisse zu erzielen?).

Tiermodelle (insb. Mäuse- und Ratten) bilden am genauesten die Komplexität des Gehirnes und pathophysiologische Zustände ab. Das Genom der Tiere kann durch vielfältige Techniken modifiziert und der Phänotyp kann auf unterschiedlichen Ebenen, durch molekulare und elektrophysiologische Experimente oder durch Verhaltensexperimente, untersucht werden ¹³⁷. Gleichwohl zeigen Nagermodelle auch Schwächen. Insbesondere bei der Untersuchung neuronaler Entwicklungsstörungen gibt es größere

Einschränkungen, da sich die neuronale Entwicklung zwischen Nagern und Menschen unterscheidet, wie die Unterschiede in den Expressionsmustern von Genen, welche für die Bildung von Neurofilamenten, Synapsen und Ionenkanälen wichtig sind, zeigen ¹³⁸. Auch depdc5-Mausmodelle zeigen einen variablen Phänotyp und reproduzieren nur zum Teil den klinischen Phänotyp ¹³³. Als weitere Nachteile sind die hohen Kosten, der hohe Zeitaufwand und auch ethische Fragen zu nennen ¹³⁹. Tabelle 6 vergleicht, unter besonderer Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, die SH-SY5Y-Zelllinie mit drei weiteren etablierten humanen Zelllinien (i) humanes neuronales Gewebe (postmortem oder nach epilepsiechirurgischen Eingriffen) ii) human neural progenitor cells (hNPCs) iii) induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)).

Tabelle 6 Vor- (⊕) und Nachteile (⊖) neuronaler Zellmodelle nach den Kriterien von Dolmetsch und Geschwind; Fettgedrucktes: Ergebnisse aus dieser Studie

Zellmodell	Relevanz für den Menschen	Einblick in Pathomechanismen	Durchsatz
humane neuronale Proben	⊕ stellen am besten Pathologie in vivo dar ⊖ Zeigen späte Stadien der Krankheit	⊖ Zellkultur nur eingeschränkt möglich ⊖ wenige Einblick in zelluläre Pathomechanismen	⊖ gering, da Material post-mortem oder aus epilepsiechirurgischen Eingriffen gewonnen wird
Quellen: ^{135,136}			
humane neurale Progenitorzellen (hNPC)	⊕ Humane Zellen ⊖ unklarer genetischer Background	⊕ Zellkultur möglich ⊕ Differenzieren zu neuronalem Phänotyp	⊖ schwer zu Kultivieren ⊖ hohe Kosten
Quellen: ^{136, 124}			
Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)	⊕ Zellmodell von betroffenen Patienten möglich ⊕ Potential als Therapeutikum	⊕ Zellkultur möglich ⊕ Generierung unterschiedlicher Zelltypen möglich ⊕ Untersuchung neuronaler Netzwerke,	⊖ Kultivierung zeitaufwendig ⊖ hohe Kosten ⊖ Generierung isogener

		Faltung und Schichtung in 3 D Kulturen möglich ⊕ bilden Synapsen aus ⊖ Ergebnisse noch mit hoher Varianz, weitere Notwendigkeit für standardisierte Protokolle	Kontrollzelllinien schwierig
Quellen: 135,140-144			
SH-SY5Y: humane Neuroblastom- zellen	⊕ stellen frühe neuronale Entwicklungsstufen dar ⊖ onkogener Ursprung	⊕ Differenzieren zu neuronalem Phänotyp ⊕ mTOR- Überaktivierung verlässlich nachweisbar ⊖ unterschiedliche Zelltypen (S-Typ und N- Typ) ⊖ Bilden keine Synapsen	⊕ Kosten niedrig ⊕ Kultivierung verhältnismäßig einfach ⊕ große Mengen an Zellen leicht zu generieren ⊖ Generierung von KO-Zelllinien aus Einzelzellkolonien zeitaufwendig (ca. 5 Monate)
Quellen: 77,80,143,145-147			

4.8 SH-SY5Y-Zellmodelle können einen Beitrag in der Epilepsieforschung leisten

Das Ziel genetischer Studien ist das Wissen über neurobiologische Grundlagen zu verbessern und dieses in die klinische Praxis zu übertragen ¹⁴⁸. Vor allem iPSCs nehmen in den letzten Jahren eine zunehmende Rolle in den Neurowissenschaften ein und sollen daher im folgenden Absatz genauer mit der SH-SY5Y-Zelllinie verglichen werden. Für mehrere neuronale Entwicklungsstörungen sind bereits iPSCs-Zellmodelle etabliert, so auch für DEPDC5 ⁷², TSC1 und TSC2 ¹⁴⁹. iPSCs können direkt aus Patientenmaterial (z.B. Fibroblasten) generiert werden. Die patienteneigenen Zellen werden kultiviert und durch Expression spezieller Transkriptionsfaktoren zu Stammzellen umprogrammiert ¹⁵⁰. In einem zweiten Schritt können die iPSCs zu unterschiedlichen Neuronentypen differenziert werden ¹⁵¹. iPSCs besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, ohne einen onkogenen Ursprung zu haben. Die Differenzierung mittels der gezielten Expression von Transkriptionsfaktoren führt zu relativ stabilen neuronalen Kulturen ¹⁵². RA und BDNF, welche die mTOR-Aktivität beeinflussen, sind zur Differenzierung der iPSCs nicht notwendig. iPSCs erlauben es die patientenindividuelle Mutation einschließlich des „genetischen Backgrounds“ im Zellmodell zu untersuchen ohne weitere Genomeditierungstechniken (einhergehend mit dem Risiko für Off-Target-Effekte) einsetzen zu müssen. Zudem ist die Generierung von neuronalen 3D-Modellen möglich ist, bei denen die Entwicklung der Gehirnschichtung und Gyrierung untersucht werden kann ¹⁵³.

Dem gegenüber steht das SH-SY5Y-Zellmodell, in dem trotz des onkogenen Ursprungs die relevanten regulatorischen genetischen Netzwerke gut konserviert sind ⁷⁷. Diese und andere Studien zeigen, dass sowohl funktionelle als auch neuromorphologische Aspekte im SH-SY5Y-Modell gut untersucht werden können. Vorteile der SH-SY5Y Modelle gegenüber den iPSC-Modellen sind die niedrigen Kosten und die schnelle Kultivierung. Eine weitere große Schwierigkeit stellt die Generierung von isogenen Kontrollzelllinien in iPSCs dar. iPSCs, welche von gesunden Probanden gewonnen werden, haben das Risiko, dass der genetische Background die Ergebnisse verfälscht. iPSCs, in denen mittels Genom-Editierung die Mutation korrigiert wird, erfordern einen zusätzlichen

zeitlichen und finanziellen Einsatz und haben ein Risiko für Off-Target-Effekte ¹³⁵. Hier zeigt sich ein weiterer Vorteil des SH-SY5Y-Zellmodells. Die Generierung von Kontrollen kann, wie in dieser Studie gezeigt, parallel und ohne zeitlichen Zusatzaufwand durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der in dieser Studie generierten und validierten DEPDC5-KO-SH-SY5Y bestätigen die genannten Vorteile der SH-SY5Y. Als wichtigstes Ergebnis ist zu nennen, dass die Zelllinien verlässlich den Zusammenhang zwischen Genotyp (homozygoter DEPDC5-KO) und Phänotyp (mTOR-Überaktivierung) reproduzieren. Hierdurch konnte das wesentliche funktionelle Merkmal von mTORopathien in-vitro dargestellt werden. Die Grundlagenforschung erfordert häufig die Kombination unterschiedlicher, sich ergänzender Zellmodelle. Dies kann dabei helfen Ergebnisse zu validieren und modellspezifische Einflussfaktoren zu identifizieren, aber auch kosteneffektiv und ressourcensparend zu arbeiten ¹⁴⁶. Das robuste SH-SY5Y-Zellmodell kann am Anfang eines Versuchsaufbaus stehen und die Ergebnisse können in weiteren Modellen (z.B. iPSCs, Mausmodell) repliziert und weitergehend untersucht werden. Um klonale Unterschiede zu berücksichtigen, sollten die Zelllinien, wie in dieser Studie geschehen, zuvor funktionell validiert werden. Erste Anwendung fand das in dieser Arbeit generierte Zellmodell bereits bei der Etablierung von mTOR-spezifischen diagnostischen Labormethoden für die wesentlich empfindlicheren hNPCs ¹²⁴.

4.9 Limitationen

Eine Limitation dieser Studie ist, dass sich in Bezug auf die erwarteten neuromorphologischen Veränderungen nur ein Trend nachweisen ließ und die Ergebnisse sich nicht konsistent in allen 4 DEPDC5-KO-Zelllinien zeigten. Die Experimente an in-vitro Modellen werden idealerweise an niedrigen Passagen durchgeführt, um den Einfluss von spontanen Mutationen und epigenetischen Effekten zu minimieren. In dieser Studie befanden sich alle DEPDC5-Knockout-Zelllinien, von der Transfektion der CRISPR/Cas9-sgRNA bis zur Sequenzierung, für etwa 5 Monate durchgängig in Zellkultur. Hinzukommt, dass die Zelllinien aus Einzelzellklonen gewonnen wurden. Dieser zelluläre Stress

könnte morphologische Aspekte weiterhin beeinflusst haben. Für SH-SY5Y stellt zudem die Dauer der Kultivierung einen negativer Einflussfaktor auf die Fähigkeit der Differenzierung dar. 20 Wochen Kultivierung führten zu einer Zunahme an S-Typ-SH-SY5Y ⁷⁴ und Encinas et al. stellten fest, dass S-Typ-SH-SY5Y unter Zugabe von RA und BDNF keinen neuronalen Phänotyp mehr entwickeln ⁸⁰. Unsicker et al. nutzten für ihre Experimente an SHANK2 als Transfektionsmethode Lipofectamin in SH-SY5Y. Zudem sortierten sie die Einzelzellen mittels FACS anhand des GFP-Signals (im CRISPR/Cas9-Konstrukt befand sich ein GFP-Vektor). Dies scheint eine zellschonendere Methode darzustellen, denn somit lag die Dauer zwischen Transfektion und Sequenzierung bei 1-3 Monaten ¹⁰¹. Möglicherweise wurden auch die Ergebnisse der FACS-Messung durch die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften (S-Typ und N-Typ) der SH-SY5Y beeinflusst.

Weiterhin als methodisch einschränkend ist zu erwähnen, dass die Zu- bzw. Abnahme an phosphoryliertem S6 bzw. AKT nur deskriptiv beschrieben wurde. Interessant wäre gewesen, die morphologischen Unterschiede und das Signal im Western Blot auf Korrelation zu untersuchen. Hierfür hätte die quantitative Bestimmung des Proteins mittels Densitometrie erfolgen können¹⁵⁴.

Die Sholl-Analyse stellt eine etablierte Methode zur Beschreibung der neuronalen Komplexität dar ¹⁵⁵ und hat bereits mehrfach Anwendung bei SH-SY5Y gefunden ¹⁰⁰. Die Umwandlung der Fluoreszenzphotografien in ein binäres Bild, sowie die Sholl-Analyse wurden automatisiert in ImageJ durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen Neuron und Hintergrund fand auf Grundlage der Intensität des Fluoreszenzsignales statt („intensity thresholding“). Wir vermuten, dass das stärkere Fluoreszenzsignal des Somas im Vergleich zu den Dendriten (im Soma befindet sich mehr GFP), zu einer Überschätzung der Größe des Zellsomas führte und dadurch somanahe Veränderungen in der neuronalen Arborisierung nicht exakt beschrieben wurden. Zur Reduktion der Artefakte könnte die Anwendung manueller *tracingtools* beitragen (z.B. *simple neurite tracer* in ImageJ). Dabei sollten mehrere Untersucher verblindet die Zellen auswerten, um den Beobachterbias zu reduzieren.

4.10 Ausblick

Für folgende Studien wäre zunächst von Interesse die funktionale Charakterisierung der DEPDC5-KO-SH-SY5Y fortzuführen. Zunächst könnte untersucht werden, ob die beschriebenen Effekte einer mTOR-Überaktivierung unter Hinzugabe eines pharmakologischen mTOR-Inhibitors wie beispielsweise Rapamycin wieder rückgängig gemacht werden können. Weiterhin wäre es interessant die Untersuchung der mTOR-Überaktivierung auch auf die Untersuchung von Genexpressionsmustern unter Anwendung der *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA) auszuweiten. Durch den Vergleich der Expressionsmuster von Wildtyp-SH-SY5Y, DEPDC5-KO, in proliferierendem und differenzierendem Zustand, sowie unter Zugabe von Rapamycin könnten korrelierende Gene identifiziert werden und neue Erkenntnisse bezüglich der vielfältigen regulatorischen Aspekte des mTOR-Signalweges gewonnen werden. Möglicherweise könnten hier auch neue Erkenntnisse hinsichtlich der uneinheitlichen morphologischen Ergebnisse gewonnen werden. Diese Studie zeigt, dass CRISPR/Cas9 das Genom in SH-SY5Y effektiv modifiziert. Die hier angewendete Methode des nonhomologous end joining ermöglicht dabei nicht die Insertion einer spezifischen Mutation. Für eine Folgestudie könnte daher die Insertion einer Mutation, deren Pathogenität in-vivo gesichert ist, von großem Interesse sein. Hierfür könnte zusätzlich zu dem CRISPR/Cas9-Konstrukt eine spezifische Reperatursequenz hinzugegeben werden⁹⁰. Die standardisierte Generierung der Zelllinien könnte in einem letzten Schritt auf weitere mTOR-assoziierte Epilepsiegene wie beispielsweise NPRL2 und NPRL3 ausgeweitet werden. Von besonderem Interesse wäre im Anschluss der Vergleich der unterschiedlichen SH-SY5Y-KO-Zelllinien auf transkriptionaler und funktionaler Ebene, um den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp besser verstehen zu können.

5 Fazit

Diese Studie zeigt, dass das SH-SY5Y-Zellmodell verlässlich den Zusammenhang zwischen DEPDC5-Knockout und mTOR-Überaktivierung darstellen kann. Unter Berücksichtigung der kostengünstigen und leichten Kultivierbarkeit ist das SH-SY5Y ein geeignetes Modell, um die Pathomechanismen einer mTOR-Überaktivierung weiter untersuchen zu können. Im Vergleich mit reiferen Zellmodellen (z.B. iPSCs) stellen die SH-SY5Y insbesondere für high-throughput Methoden und Screening Assays ein kostengünstiges und stabiles Alternativmodell dar. Die funktionelle Validierung der Zelllinien ist dabei wichtig, um den Einfluss klonaler Unterschiede zu minimieren. Weitere Forschung erscheint notwendig, um diese klonalen Unterschiede in den in-vitro-Modellen, aber auch die phänotypische Variabilität zwischen den betroffenen Patienten besser verstehen zu können.

Anhang

Tabelle 7 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5' nach 3')
Validierung CRISPR/CAS9-Plasmid	
LKO1_5_primer	GACTATCATATGCTTACCGT
Human U6 Fwd primer	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC
Sequenzierung sgRNA	
DEPDC5_Ex2.1_fw	CACCGCAAACCTCGTCATCCACAAGA
DEPDC5_Ex2.1_rev	AAACTCTTGTGGATGACGAGTTTGC
DEPDC5_Ex2.2_fw	CACCGTGCAAGATGAGAACAACAA
DEPDC5_Ex2.2_rev	AAACTTGTGTTCTCATCTTGAC
DEPDC5_Ex3_fw	CACCGTTGATGTGAGGGAACACTTT
DEPDC5_Ex3_rev	AAACAAAGTGTCCCTCACATCAAC
Validierung DEPDC5-Knockout	
DEPDC5_Ex2_fw_val	CCCTTAGTTCCTGGATTCTGTG
DEPDC5_Ex2_rv_val	TAGTCTGTTTAGTCGCCTGTTTAG
DEPDC5_Ex3_fw_val_v2	CTACTTGAAGTGGCTGAATTGT
DEPDC5_Ex3_rv_val_v2	TTTGAAAGGCAAAGAGAGCTA

Tabelle 8 Primer RT-RT-PCR

Genname	Referenzsequenz	Sequenzierung vorwärts	Sequenzierung rückwärts
DEPDC5	NM_001242896.1	CTACAAGATAGTAACGGACAAGAGC	CTGGAAGCTGGCGAAGTC
GAPDH	NM_002046.3	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
GUSB	NM_000181.3	CGCCCTGCCTATCTGTATTC	GATGAGGAACTGGCTCTTGG
ACTB	NM_001101.3	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
POLR2F	NM_021974	GATGAAGGGCTAGATGACTTGG	CCAGAGGGGAGGATCTCG

Tabelle 9 ImageJ: Code Erstellung Binary

```
run("Set Scale...", "distance=2.035 known=1 pixel=1 unit=µm global");
setMinAndMax(10, 160)
call("ij.ImagePlus.setDefault16bitRange", 0);
run("Subtract Background...", "rolling=25 sliding");
run("Despeckle"); run("Despeckle");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Triangle dark");
run("Make Binary");
run("Despeckle");
run("Dilate");
```

Tabelle 10 ImageJ: Code Sholl-Analyse

```
run("Sholl Analysis...", "starting=5 ending=NaN radius_step=1 #_samples=3
integration=Mean enclosing=1 #_primary=[] infer fit linear polynomial=[5th
degree] most normalizer=Area");
```

Literaturverzeichnis

1. Singh A, Trevick S. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol Clin.* 2016;34(4):837-847. doi:10.1016/j.ncl.2016.06.015.
2. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology.* 2017;88(3):296-303. doi:10.1212/WNL.0000000000003509.
3. Sillanpää M, Shinnar S. Long-term mortality in childhood-onset epilepsy. *N Engl J Med.* 2010;363(26):2522-2529. doi:10.1056/NEJMoa0911610.
4. Terman SW, Hill CE, Burke JF. Disability in people with epilepsy: A nationally representative cross-sectional study. *Epilepsy Behav.* 2020;112:107429. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107429.
5. Wang J, Lin Z-J, Liu L, et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure.* 2017;44:11-20. doi:10.1016/j.seizure.2016.11.030.
6. Pal DK, Pong AW, Chung WK. Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(8):445-453. doi:10.1038/nrneurol.2010.92.
7. Striano P, Minassian BA. From Genetic Testing to Precision Medicine in Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2020;17(2):609-615. doi:10.1007/s13311-020-00835-4.
8. Reif PS, Tsai M-H, Helbig I, Rosenow F, Klein KM. Precision medicine in genetic epilepsies: break of dawn? *Expert review of neurotherapeutics.* 2017;17(4):381-392. doi:10.1080/14737175.2017.1253476.
9. Kearney H, Byrne S, Cavalleri GL, Delanty N. Tackling Epilepsy With High-definition Precision Medicine: A Review. *JAMA Neurol.* 2019. doi:10.1001/jamaneurol.2019.2384.
10. Golyala A, Kwan P. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. *Seizure.* 2017;44:147-156. doi:10.1016/j.seizure.2016.11.022.
11. Jameson JL, Longo DL. Precision medicine--personalized, problematic, and promising. *N Engl J Med.* 2015;372(23):2229-2234. doi:10.1056/NEJMs1503104.
12. Wolking S, Moreau C, McCormack M, et al. Assessing the role of rare genetic variants in drug-resistant, non-lesional focal epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021. doi:10.1002/acn3.51374.

13. Myers KA, Scheffer IE. DEPDC5 as a potential therapeutic target for epilepsy. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;1-10. doi:10.1080/14728222.2017.1316715.
14. Stein JL, La Torre-Ubieta L de, Tian Y, et al. A quantitative framework to evaluate modeling of cortical development by neural stem cells. *Neuron*. 2014;83(1):69-86. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.035.
15. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4):470-472. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.
16. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-482. doi:10.1111/epi.12550.
17. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE-Klassifikation der Epilepsien: Positionspapier der ILAE-Kommission für Klassifikation und Terminologie. *Z Epileptol*. 2018;31(4):296-306. doi:10.1007/s10309-018-0218-6.
18. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512-521. doi:10.1111/epi.13709.
19. Richard AE, Scheffer IE, Wilson SJ. Features of the broader autism phenotype in people with epilepsy support shared mechanisms between epilepsy and autism spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;75:203-233. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.12.036.
20. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-685. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.
21. Vezzani A, Fujinami RS, White HS, et al. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathologica*. 2016;131(2):211-234. doi:10.1007/s00401-015-1481-5.
22. Peljto AL, Barker-Cummings C, Vasoli VM, et al. Familial risk of epilepsy: a population-based study. *Brain*. 2014;137(Pt 3):795-805. doi:10.1093/brain/awt368.
23. Miller LL, Pellock JM, DeLorenzo RJ, Meyer JM, Corey LA. Univariate genetic analyses of epilepsy and seizures in a population-based twin study: The

- Virginia twin registry. *Genet Epidemiol.* 1998;15(1):33-49. doi:10.1002/(SICI)1098-2272(1998)15:1<33:AID-GEPI3>3.0.CO;2-5.
24. Kjeldsen MJ, Kyvik KO, Christensen K, Friis ML. Genetic and environmental factors in epilepsy: a population-based study of 11 900 Danish twin pairs. *Epilepsy Research.* 2001;44(2-3):167-178. doi:10.1016/s0920-1211(01)00196-6.
25. The Epi4K Consortium. Epi4K: Gene discovery in 4,000 genomes. *Epilepsia.* 2012;53(8):1457-1467. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03511.x.
26. Thomas RH, Berkovic SF. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(5):283-292. doi:10.1038/nrneurol.2014.62.
27. Lipton JO, Sahin M. The Neurology of mTOR. *Neuron.* 2014;84(2):275-291. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.034.
28. Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience.* 2017;341:112-153. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.11.017.
29. Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):155-162. doi:10.1038/nrm3757.
30. Malik AR, Urbanska M, Macias M, Skalecka A, Jaworski J. Beyond control of protein translation: what we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834(7):1434-1448. doi:10.1016/j.bbapap.2012.12.010.
31. Crino PB. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(7):379-392. doi:10.1038/nrneurol.2016.81.
32. Rivière J-B, Mirzaa GM, O'Roak BJ, et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet.* 2012;44(8):934-940. doi:10.1038/ng.2331.
33. Orlova KA, Parker WE, Heuer GG, et al. STRADalpha deficiency results in aberrant mTORC1 signaling during corticogenesis in humans and mice. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1591-1602. doi:10.1172/JCI41592.

34. Nguyen LH, Brewster AL, Clark ME, et al. mTOR inhibition suppresses established epilepsy in a mouse model of cortical dysplasia. *Epilepsia*. 2015;56(4):636-646. doi:10.1111/epi.12946.
35. Salinas V, Vega P, Piccirilli MV, et al. Identification of a somatic mutation in the RHEB gene through high depth and ultra-high depth next generation sequencing in a patient with Hemimegalencephaly and drug resistant Epilepsy. *Eur J Med Genet*. 2019;62(11):103571. doi:10.1016/j.ejmg.2018.11.005.
36. Smith, L. D. et al. Exome Sequencing Reveals De Novo Germline Mutation of the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) in a Patient with Megalencephaly and Intractable Seizures. *Journal of Genomes and Exomes*. 2013;2:63-72. doi:10.4137/JGE.S12583.
37. Dibbens LM, Vries B de, Donatello S, et al. Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat Genet*. 2013;45(5):546-551. doi:10.1038/ng.2599.
38. Ricos MG, Hodgson BL, Pippucci T, et al. Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators NPRL2 and NPRL3 cause focal epilepsy. *Ann Neurol*. 2016;79(1):120-131. doi:10.1002/ana.24547.
39. Moloney PB, Cavalleri GL, Delanty N. Epilepsy in the mTORopathies: opportunities for precision medicine. *Brain Commun*. 2021;3(4):fcab222. doi:10.1093/braincomms/fcab222.
40. Meikle L, Talos DM, Onda H, et al. A Mouse Model of Tuberous Sclerosis: Neuronal Loss of Tsc1 Causes Dysplastic and Ectopic Neurons, Reduced Myelination, Seizure Activity, and Limited Survival. *J Neurosci*. 2007;27(21):5546-5558. doi:10.1523/JNEUROSCI.5540-06.2007.
41. Vasic V, Jones MSO, Haslinger D, et al. Translating the Role of mTOR- and RAS-Associated Signalopathies in Autism Spectrum Disorder: Models, Mechanisms and Treatment. *Genes*. 2021;12(11):1746. doi:10.3390/genes12111746.
42. Iffland PH, Carson V, Bordey A, Crino PB. GATORopathies: The role of amino acid regulatory gene mutations in epilepsy and cortical malformations. *Epilepsia*. 2019;60(11):2163-2173. doi:10.1111/epi.16370.
43. Crino PB. Evolving neurobiology of tuberous sclerosis complex. *Acta Neuropathologica*. 2013;125(3):317-332. doi:10.1007/s00401-013-1085-x.

44. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
45. Baldassari S, Licchetta L, Tinuper P, Bisulli F, Pippucci T. GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies. *Journal of medical genetics*. 2016;53(8):503-510. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103883.
46. Baldassari S, Picard F, Verbeek NE, et al. The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. *Genet Med*. 2019;21(2):398-408. doi:10.1038/s41436-018-0060-2.
47. Tinuper P et al. ILAE Classification and Definition of Epilepsy Syndromes with Onset in Childhood: Position Paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions (proposed classification). <https://www.ilae.org/files/dmfile/CHILDApril6withfigs.pdf>. Accessed December 31, 2021.
48. Riney K et al. LAE Classification and Definition of Epilepsy Syndromes with Onset at a Variable Age: Position Statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions (proposed paper). https://www.ilae.org/files/dmfile/Riney_VariableAges_7Apr21.pdf. Accessed December 31, 2021.
49. Oegema R, Barakat TS, Wilke M, et al. International consensus recommendations on the diagnostic work-up for malformations of cortical development. *Nat Rev Neurol*. 2020. doi:10.1038/s41582-020-0395-6.
50. Ishida S, Picard F, Rudolf G, et al. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet*. 2013;45(5):552-555. doi:10.1038/ng.2601.
51. Klein KM, O'Brien TJ, Praveen K, et al. Familial focal epilepsy with variable foci mapped to chromosome 22q12: expansion of the phenotypic spectrum. *Epilepsia*. 2012;53(8):e151-5. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03585.x.
52. Baulac S, Weckhuysen S. *DEPDC5-Related Epilepsy*. University of Washington, Seattle. 2016.
53. Iffland PH, Crino PB. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*. 2017;12:547-571. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100138.

54. Najm IM, Sarnat HB, Blümcke I. Review: The international consensus classification of Focal Cortical Dysplasia - a critical update 2018. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2018;44(1):18-31. doi:10.1111/nan.12462.
55. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
56. Baulac S, Ishida S, Marsan E, et al. Mensch: Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to DEPDC5 mutations. *Ann Neurol*. 2015;77(4):675-683. doi:10.1002/ana.24368.
57. Scerri T, Riseley JR, Gillies G, et al. Mensch: Familial cortical dysplasia type IIA caused by a germline mutation in DEPDC5. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(5):575-580. doi:10.1002/acn3.191.
58. Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(3):94-102. doi:10.1016/j.tem.2010.12.003.
59. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):307-318. doi:10.1038/nrm2672.
60. Iffland PH, Baybis M, Barnes AE, Leventer RJ, Lockhart PJ, Crino PB. Maus Zellkultur, Mensch: DEPDC5 and NPRL3 modulate cell size, filopodial outgrowth, and localization of mTOR in neural progenitor cells and neurons. *Neurobiol Dis*. 2018. doi:10.1016/j.nbd.2018.02.013.
61. Ribierre T, Deleuze C, Bacq A, et al. Maus, Mensch: Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia-associated epilepsy. *J Clin Invest*. 2018;128(6):2452-2458. doi:10.1172/JCI99384.
62. Hughes J, Dawson R, Tea M, et al. Maus: Knockout of the epilepsy gene *Depdc5* in mice causes severe embryonic dysmorphology with hyperactivity of mTORC1 signalling. *Sci Rep*. 2017;7(1):12618. doi:10.1038/s41598-017-12574-2.
63. Yuskaitis, Jones BM, Wolfson RL, et al. A mouse model of DEPDC5-related epilepsy: Neuronal loss of *Depdc5* causes dysplastic and ectopic neurons, increased mTOR signaling, and seizure susceptibility. *Neurobiol Dis*. 2018;111:91-101. doi:10.1016/j.nbd.2017.12.010.
64. Yuskaitis CJ, Rossitto L-A, Gurnani S, Bainbridge E, Poduri A, Sahin M. Maus: Chronic mTORC1 inhibition rescues behavioral and biochemical deficits

- resulting from neuronal *Depdc5* loss in mice. *Hum Mol Genet.* 2019;28(17):2952-2964. doi:10.1093/hmg/ddz123.
65. Dawson RE, Nieto Guil AF, Robertson LJ, Piltz SG, Hughes JN, Thomas PQ. Functional screening of GATOR1 complex variants reveals a role for mTORC1 deregulation in FCD and focal epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2020;134:104640. doi:10.1016/j.nbd.2019.104640.
66. Fusco A de, Cerullo MS, Marte A, et al. Maus: Acute knockdown of *Depdc5* leads to synaptic defects in mTOR-related epileptogenesis. *Neurobiol Dis.* 2020;139. doi:10.1016/j.nbd.2020.104822.
67. Weston M. Getting Sucker Punched by *Depdc5* Really Hurts. *Epilepsy Curr.* 2020;20(6):378-380. doi:10.1177/1535759720956992.
68. Marsan E, Ishida S, Schramm A, et al. *Depdc5* knockout rat: A novel model of mTORopathy. *Neurobiol Dis.* 2016;89:180-189. doi:10.1016/j.nbd.2016.02.010.
69. Hu S, Knowlton RC, Watson BO, et al. Ratte: Somatic *Depdc5* deletion recapitulates electroclinical features of human focal cortical dysplasia type IIA. *Ann Neurol.* 2018;84(1):140-146. doi:10.1002/ana.25272.
70. Swaminathan A, Hassan-Abdi R, Renault S, et al. Zebra: Non-canonical mTOR-Independent Role of *DEPDC5* in Regulating GABAergic Network Development. *Curr Biol.* 2018;28(12):1924-1937.e5. doi:10.1016/j.cub.2018.04.061.
71. Calbiac H de, Dabacan A, Muresan R, Kabashi E, Ciura S. Behavioral And Physiological Analysis In A Zebrafish Model Of Epilepsy. *J Vis Exp.* 2021;(176). doi:10.3791/58837.
72. Klofas LK, Short BP, Snow JP, et al. *DEPDC5* haploinsufficiency drives increased mTORC1 signaling and abnormal morphology in human iPSC-derived cortical neurons. *Neurobiol Dis.* 2020;143. doi:10.1016/j.nbd.2020.104975.
73. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. *Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture*; 1973.
74. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. Accessed November 23, 2021.

75. Pahlman S, Ruusala A-I, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*. 1984;14(2):135-144. doi:10.1016/0045-6039(84)90038-1.
76. Yusuf M, Leung K, Morris KJ, Volpi EV. Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *Neurogenetics*. 2013;14(1):63-70. doi:10.1007/s10048-012-0350-9.
77. Chiochetti AG, Haslinger D, Stein JL, et al. Transcriptomic signatures of neuronal differentiation and their association with risk genes for autism spectrum and related neuropsychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 2016;6(8):e864. doi:10.1038/tp.2016.119.
78. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*. 2004;6(6):838-845. doi:10.1593/neo.04310.
79. Ciccarone et al. 1989. Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/49/1/219.full-text.pdf>. Accessed November 25, 2021.
80. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000;75(3):991-1003.
81. Chen W-L, Mefford HC. Diagnostic Considerations in the Epilepsies-Testing Strategies, Test Type Advantages, and Limitations. *Neurotherapeutics*. 2021;18(3):1468-1477. doi:10.1007/s13311-021-01121-7.
82. Perucca P, Scheffer IE, Harvey AS, et al. Real-world utility of whole exome sequencing with targeted gene analysis for focal epilepsy. *Epilepsy Research*. 2017;131:1-8. doi:10.1016/j.eplepsyres.2017.02.001.
83. Morath C, Arns W, Schwenger V, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22 Suppl 8:viii61-viii65. doi:10.1093/ndt/gfm652.
84. Krueger DA, Care MM, Holland K, et al. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1801-1811. doi:10.1056/NEJMoa1001671.

85. Moavero R, Mühlebner A, Luinenburg MJ, Craiu D, Aronica E, Curatolo P. Genetic pathogenesis of the epileptogenic lesions in Tuberous Sclerosis Complex: Therapeutic targeting of the mTOR pathway. *Epilepsy Behav.* 2021;107713. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107713.
86. Nikolaeva I, Kazdoba TM, Crowell B, D'Arcangelo G. Differential roles for Akt and mTORC1 in the hypertrophy of Pten mutant neurons, a cellular model of brain overgrowth disorders. *Neuroscience.* 2017;354:196-207. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.04.026.
87. Borsari C, Keles E, Treyer A, et al. Second-generation tricyclic pyrimido-pyrrolo-oxazine mTOR inhibitor with predicted blood-brain barrier permeability. *RSC Med Chem.* 2021;12(4):579-583. doi:10.1039/d0md00408a.
88. Rageot D, Bohnacker T, Keles E, et al. (S)-4-(Difluoromethyl)-5-(4-(3-methylmorpholino)-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)pyridin-2-amine (PQR530), a Potent, Orally Bioavailable, and Brain-Penetrable Dual Inhibitor of Class I PI3K and mTOR Kinase. *J Med Chem.* 2019;62(13):6241-6261. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00525.
89. Schreiber KH, Arriola Apelo SI, Yu D, et al. A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo. *Nat Commun.* 2019;10(1):3194. doi:10.1038/s41467-019-11174-0.
90. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143.
91. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
92. Ristanovic D, Milosevic NT, Stulic V. Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord. *J Neurosci Methods.* 2006;158(2):212-218. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.05.030.
93. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890.
94. Maximilian Haeussler, Kai Schönig, Hélène Eckert, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA

- selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 2016;17(1):1-12. doi:10.1186/s13059-016-1012-2.
95. Iffland PH, Barnes AE, Baybis M, Crino PB. Elsevier: Dynamic analysis of 4E-BP1 phosphorylation in neurons with Tsc2 or Depdc5 knockout. *Exp Neurol.* 2020;334:113432. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113432.
96. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* 2014;157(6):1262-1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
97. Bensalel J, Xu H, Lu ML, Capobianco E, Wei J. RNA-seq analysis reveals significant transcriptome changes in huntingtin-null human neuroblastoma cells. *BMC Med Genomics.* 2021;14(1):176. doi:10.1186/s12920-021-01022-w.
98. Lauer AA, Mett J, Janitschke D, et al. Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2020;19(11):e13264. doi:10.1111/accel.13264.
99. Ma KY, Fokkens MR, Reggiori F, Mari M, Verbeek DS. Parkinson's disease-associated VPS35 mutant reduces mitochondrial membrane potential and impairs PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Transl Neurodegener.* 2021;10(1):19. doi:10.1186/s40035-021-00243-4.
100. Haslinger D, Waltes R, Yousaf A, et al. Loss of the Chr16p11.2 ASD candidate gene QPRT leads to aberrant neuronal differentiation in the SH-SY5Y neuronal cell model. *Mol Autism.* 2018;9. doi:10.1186/s13229-018-0239-z.
101. Unsicker C, Cristian F-B, Hahn M von, Eckstein V, Rappold GA, Berkel S. SHANK2 mutations impair apoptosis, proliferation and neurite outgrowth during early neuronal differentiation in SH-SY5Y cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):2128. doi:10.1038/s41598-021-81241-4.
102. Smith RH, Chen Y-C, Seifuddin F, et al. Genome-Wide Analysis of Off-Target CRISPR/Cas9 Activity in Single-Cell-Derived Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Clones. *Genes.* 2020;11(12). doi:10.3390/genes11121501.

103. Picard F, Makrythanasis P, Navarro V, et al. DEPDC5 mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*. 2014;82(23):2101-2106. doi:10.1212/WNL.0000000000000488.
104. Pereira FJC, Teixeira A, Kong J, et al. Resistance of mRNAs with AUG-proximal nonsense mutations to nonsense-mediated decay reflects variables of mRNA structure and translational activity. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(13):6528-6544. doi:10.1093/nar/gkv588.
105. Magri L, Galli R. mTOR signaling in neural stem cells: from basic biology to disease. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(16):2887-2898. doi:10.1007/s00018-012-1196-x.
106. Lasarge CL, Danzer SC. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:18. doi:10.3389/fnmol.2014.00018.
107. Cheng B, Martinez AA, Morado J, Scofield V, Roberts JL, Maffi SK. *Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway*; 2013; 62.
108. An W-L, Cowburn RF, Li L, et al. Up-Regulation of Phosphorylated/Activated p70 S6 Kinase and Its Relationship to Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*. 2003;163(2):591-607. doi:10.1016/S0002-9440(10)63687-5.
109. Komata Y, Tsubota S, Sakamoto K, Ikematsu S, Kadomatsu K. Screening of novel Midkine binding protein by BioID2-based proximity labeling. *Nagoya J Med Sci*. 2021;83(3):495-508. doi:10.18999/nagjms.83.3.495.
110. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*. 1999;13(11):1422-1437. doi:10.1101/gad.13.11.1422.
111. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005;123(4):569-580. doi:10.1016/j.cell.2005.10.024.
112. Biever A, Valjent E, Puighermanal E. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:75. doi:10.3389/fnmol.2015.00075.

113. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 2011;146(3):408-420. doi:10.1016/j.cell.2011.06.034.
114. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 2016;351(6274):728-733. doi:10.1126/science.aad0489.
115. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152.
116. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J*. 2012;31(5):1095-1108. doi:10.1038/emboj.2012.32.
117. LiCausi F, Hartman NW. Role of mTOR Complexes in Neurogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5). doi:10.3390/ijms19051544.
118. Guarnieri FC, Chevigny A de, Falace A, Cardoso C. Disorders of neurogenesis and cortical development. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2018;20(4):255-266. doi:10.31887/DCNS.2018.20.4/ccardoso.
119. Fishwick KJ, Li RA, Halley P, Deng P, Storey KG. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Dev Biol*. 2010;338(2):215-225. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.001.
120. Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J Neurosci*. 2005;25(49):11300-11312. doi:10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005.
121. Piper M, Lee AC, van Horck FPG, et al. Differential requirement of F-actin and microtubule cytoskeleton in cue-induced local protein synthesis in axonal growth cones. *Neural Dev*. 2015;10:3. doi:10.1186/s13064-015-0031-0.
122. Morita T, Sobue K. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem*. 2009;284(40):27734-27745. doi:10.1074/jbc.M109.008177.
123. Urbanska M, Gozdz A, Swiech LJ, Jaworski J. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(36):30240-30256. doi:10.1074/jbc.M112.374405.

124. Mattson Jones. *Elucidating the molecular pathology of DEPDC5 mutation induced mTOR-hyperactivation associated with epilepsy and autism spectrum disorder.*
125. Torrence ME, MacArthur MR, Hosios AM, et al. The mTORC1-mediated activation of ATF4 promotes protein and glutathione synthesis downstream of growth signals. *eLife*. 2021;10. doi:10.7554/eLife.63326.
126. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(11):2477-2488. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0330.
127. Gracia López-Carballo, Lucrecia Moreno, Susana Masial, Paloma Pelàrez, Domingo Baretino. Editorial Board. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(28):i-ii. doi:10.1016/S0021-9258(19)66425-2.
128. Cañón E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell*. 2004;15(12):5583-5592. doi:10.1091/mbc.e04-05-0439.
129. Illendula A, Fultang N, Peethambaran B. Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements. *Oncol Rep*. 2020;44(3):1013-1024. doi:10.3892/or.2020.7681.
130. Takei N, Inamura N, Kawamura M, et al. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci*. 2004;24(44):9760-9769. doi:10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004.
131. Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*. 2010;70(5):304-322. doi:10.1002/dneu.20765.
132. Manadas B, Santos AR, Szabadfi K, et al. BDNF-induced changes in the expression of the translation machinery in hippocampal neurons: protein levels and dendritic mRNA. *J Proteome Res*. 2009;8(10):4536-4552. doi:10.1021/pr900366x.
133. Parenti I, Rabaneda LG, Schoen H, Novarino G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. *Trends Neurosci*. 2020;43(8):608-621. doi:10.1016/j.tins.2020.05.004.

134. Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res.* 2017;42(7):1873-1888. doi:10.1007/s11064-017-2222-z.
135. Niu W, Parent JM. Modeling genetic epilepsies in a dish. *Dev Dyn.* 2020;249(1):56-75. doi:10.1002/dvdy.79.
136. Dolmetsch R, Geschwind DH. The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell.* 2011;145(6):831-834. doi:10.1016/j.cell.2011.05.034.
137. Mantegazza M, Rusconi R, Scalmani P, Avanzini G, Franceschetti S. Epileptogenic ion channel mutations: from bedside to bench and, hopefully, back again. *Epilepsy Research.* 2010;92(1):1-29. doi:10.1016/j.eplepsyres.2010.08.003.
138. Zeng H, Shen EH, Hohmann JG, et al. Large-scale cellular-resolution gene profiling in human neocortex reveals species-specific molecular signatures. *Cell.* 2012;149(2):483-496. doi:10.1016/j.cell.2012.02.052.
139. Frimat J-P, Lutge R. The Need for Physiological Micro-Nanofluidic Systems of the Brain. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:100. doi:10.3389/fbioe.2019.00100.
140. Kumar S, Blangero J, Curran JE. Induced Pluripotent Stem Cells in Disease Modeling and Gene Identification. *Methods Mol Biol.* 2018;1706:17-38. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9_2.
141. Chlebanowska P, Tejchman A, Sułkowski M, Skrzypek K, Majka M. Use of 3D Organoids as a Model to Study Idiopathic Form of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3). doi:10.3390/ijms21030694.
142. Sterlini B, Fruscione F, Baldassari S, Benfenati F, Zara F, Corradi A. Progress of Induced Pluripotent Stem Cell Technologies to Understand Genetic Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2). doi:10.3390/ijms21020482.
143. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:328. doi:10.3389/fcell.2020.00328.
144. Liu L, Chen Z-R, Xu H-Q, et al. DEPDC5 Variants Associated Malformations of Cortical Development and Focal Epilepsy With Febrile Seizure Plus/Febrile Seizures: The Role of Molecular Sub-Regional Effect. *Front Neurosci.* 2020;14:821. doi:10.3389/fnins.2020.00821.

145. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):17-28. doi:10.1007/978-3-211-73574-9_3.
146. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):10. doi:10.1186/s13024-017-0149-0.
147. Lopes FM, Bristot IJ, da Motta LL, Parsons RB, Klamt F. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *Neuromolecular Med.* 2017;19(2-3):241-255. doi:10.1007/s12017-017-8454-x.
148. Tărlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-7. doi:10.1038/s12276-018-0129-7.
149. Afshar Saber W, Sahin M. Recent advances in human stem cell-based modeling of Tuberous Sclerosis Complex. *Mol Autism.* 2020;11(1):16. doi:10.1186/s13229-020-0320-2.
150. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
151. Yap MS, Nathan KR, Yeo Y, et al. Neural Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells for Nontherapeutic Applications: Toxicology, Pharmacology, and In Vitro Disease Modeling. *Stem Cells International.* 2015;2015:105172. doi:10.1155/2015/105172.
152. Zhang Y, Pak C, Han Y, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron.* 2013;78(5):785-798. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.029.
153. Gordon A, Geschwind DH. Human in vitro models for understanding mechanisms of autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2020;11(1):26. doi:10.1186/s13229-020-00332-7.
154. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:361590. doi:10.1155/2014/361590.
155. Bird AD, Cuntz H. Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. *Cell Rep.* 2019;27(10):3081-3096.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.097.

6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Freitag bedanken. Neben der Möglichkeit zur Promotion konnte ich durch diese Arbeit erstmals engere Kontakte zur Kinder- und Jugendpsychiatrie knüpfen. Ich bin sehr dankbar, dass ich mich im Anschluss an mein Studium auch als Arzt in der Kinder- und Jugendpsychiatrie Frankfurt dieser Fachrichtung widmen konnte, die mich täglich mit sehr viel Freude erfüllt.

Ich möchte mich darüber hinaus bei allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des molekulargenetischen Labors bedanken. Andreas, Denise, Regina, Afsheen, Silvia, Mattson, Inken, vielen Dank für eure Unterstützung, Verständnis, Erläuterungen und vor allem für die vielen schönen Momente inner- und außerhalb des Labors.

Zudem möchte ich all meinen Kollegen und Kolleginnen in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie für die tolle klinische Zusammenarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern und Tanten. Vielen Dank für eure Unterstützung seit Tag 1!

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Valentina danken. Vieles in den letzten Jahren wäre ohne deine Hilfe nicht möglich gewesen. Danke für deine bedingungslose Unterstützung, auf die ich mich jederzeit verlassen kann.

7 Lebenslauf