

Horst-Andreas Obenhaus
Dr. med.

Chemogenetic silencing of neuronal networks *in vitro* and *in vivo*

Fach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. Joachim Kirsch

The causal interrogation of neuronal networks involved in specific behaviors requires the spatially and temporally controlled modulation of neuronal activity. The strong influence of this experimental approach in modern Neuroscience is best documented by the rapidly expanding field of optogenetics, which permits a very selective control of neuronal activity on millisecond time scales. However, the causal link between the activity in distributed neuronal networks and long term memory or multiple trial based learning cannot be analyzed on these very short time scales. For the long-term manipulation of neuronal activity, chemogenetic tools provide a reasonable alternative.

In this thesis I used an Ivermectin activated chloride ion channel, deduced from the α_1 subunit of the human glycine receptor ($\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$), to reversibly inhibit neuronal activity *in vitro* and *in vivo*. The common anthelmintic drug Ivermectin can activate $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ in the nanomolar range while its intrinsic glycine sensitivity is strongly attenuated. Using recombinant adeno-associated virus based expression vectors I could demonstrate the responsiveness of $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ expressing HEK 293 cells to nanomolar concentrations of Ivermectin. Furthermore, the bath application of 50–100 nM Ivermectin decreased the excitability and abolished Gabazine induced epileptogenic activity of primary hippocampal neurons expressing $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$. In mice, the unilateral expression of $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ in the striatum induced a reversible and re-inducible rotational phenotype after intraperitoneal Ivermectin injection, which reached its peak 12 hours after drug injection and reversed to baseline within one week after Ivermectin treatment. Bilateral expression of $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ in the hippocampus mediated Ivermectin dependent hyperactivity and a spatial working memory deficit in a rewarded, non-matching to sample paradigm. Moreover, bilateral expression of $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ in the olfactory bulb evoked a transient, Ivermectin dependent deficit in odor discrimination and odor activated c-Fos expression in the olfactory bulb was abolished in neurons exhibiting strong $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ expression. The Ivermectin promoted silencing of olfactory bulb neurons had a strong impact on neuronal ensemble activity as disclosed by a reversible shift of gamma peak frequency in local olfactory bulb networks after Ivermectin injection.

Together these results demonstrate that Ivermectin dependent long term, reversible and re-inducible silencing of $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ expressing neurons is a promising tool for the interrogation of

network function in learning and memory.

Heutzutage gibt es eine Fülle von molekularen Werkzeugen, die es ermöglichen, neuronale Aktivität räumlich und zeitlich kontrolliert zu hemmen. Dies ermöglicht es von korrelativen Studien des Gehirns zur Erforschung von Kausalzusammenhängen überzugehen. Vor allem die Techniken der Optogenetik haben in den letzten zehn Jahren raschen Zulauf bekommen. Sie ermöglichen es, neuronale Erregbarkeit auf Millisekunden genau zu steuern. Allerdings kann der ursächliche Zusammenhang zwischen der Aktivität in neuronalen Netzwerken und zum Beispiel dem Langzeitgedächtnis nicht auf diesen kurzen Zeitskalen analysiert werden. Eine sinnvolle Alternative zur langfristigen Manipulation neuronaler Aktivität bieten chemogenetische Werkzeuge.

In dieser Arbeit habe ich die Anwendbarkeit eines Ivermectin aktivierbaren Chloridionenkanals im Hinblick auf die reversible Hemmung von Nervenzellaktivität *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dieses Protein ist abgeleitet von der alpha 1 Untereinheit des humanen Glyzinrezeptors ($\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$) und wird durch nanomolare Konzentrationen der Droge Ivermectin aktiviert, während seine intrinsische Glyzinsensitivität stark vermindert ist. Dies bildet die Grundlage für Ivermectin spezifische Hemmung von Nervenzellaktivität. Ich habe dazu rekombinante, adeno-assoziierte Viren konstruiert, welche $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ unter dem Neuronen spezifischen Synapsinpromoter exprimieren. In-vitro-Studien mit diesem Konstrukt zeigten die Reaktion von $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ in HEK 293 Zellen auf nanomolare IVM Konzentrationen. Zudem verminderte die Applikation von 50-100 nM IVM die Erregbarkeit und unterbrach Gabazin induzierte epileptogene Aktivität in Netzwerken von $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ exprimierenden Nervenzellen.

Die unilaterale Expression von $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ im Striatum von Mäusen induzierte einen reversiblen Rotationsphänotyp nach der intraperitonealen Injektion von Ivermectin. Dieser Effekt erreichte seine höchste Ausprägung 12 Stunden nach Injektion von IVM, war innerhalb einer Woche reversibel und durch wiederholte Injektion der Droge erneut induzierbar. Bilaterale Expression von $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ im Hippocampus führte zu Ivermectin induzierbarer Hyperaktivität und erzeugte Defizite in einem Test auf Integrität des Kurzzeitgedächtnisses. Bilaterale Expression von $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ im Riechkolben führte nach der Injektion von IVM zu einem vorübergehenden Defizit in der Fähigkeit zwischen zwei Gerüchen zu unterscheiden. Die Immunfluoreszenzfärbung von c-Fos in Mäusen, die einseitig $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ im Riechkolben exprimierten, zeigte eine Abnahme der c-Fos Expression welche begrenzt war auf Zellen mit hoher Virusexpression. Zusätzlich konnte ich nach der Injektion von IVM eine reversible Verlangsamung von Gamma Oszillationen (40-100 Hz) im Riechkolben beobachten. Auch dieser Effekt war innerhalb einer Woche reversibel und danach mit einer weiteren IVM Injektion erneut induzierbar.

Zusammen gefasst zeigen die durchgeführten Experimente, dass $\text{GlyR}\alpha_1^{\text{AG}}$ zur gehirnweiten, reversiblen und re-induzierbaren Hemmung von Nervenzellaktivität benutzt werden kann.