

Afshin Saffari  
Dr. med.

## **The Impact Of The TSC-mTOR Pathway On Spatiotemporal Dynamics Of Mitochondrial Metabolism In Neuronal Models Of Tuberous Sclerosis Complex**

Fach: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Kölker

Die Tuberöse Sklerose (TSC) ist eine genetische Multisystemerkrankung, die verschiedene Organsysteme, einschließlich der Haut, des Zentralnervensystems, des Herzens, der Lunge und der Nieren betreffen kann. Im Zentralnervensystem kann die TSC bereits in früher Kindheit schwere neurologische Symptome wie Epilepsie, mentale Retardierung und Autismus-Spektrum-Störungen verursachen. Die genetische Grundlage für die TSC sind *loss-of-function*-Mutationen in den Genen *TSC1* oder *TSC2*, wichtigen Regulatoren des mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1)-Signalwegs, welcher Zellwachstum, Stoffwechsel und Autophagie kontrolliert. Mutationen in diesen regulatorischen Genen bewirken eine permanente Aktivierung von mTORC1 mit schweren Folgen für Zellwachstum und neuronale Entwicklung. In Neuronen begünstigt eine konstitutive mTORC1-Aktivierung eine anabole Stoffwechsellage, während katabole Stoffwechselwege, wie die Autophagie, gehemmt werden. In diesem Zusammenspiel nehmen Mitochondrien eine besonders wichtige Stellung ein, da sie zum einen den zellulären Anabolismus unterstützen und zum anderen durch Autophagie abgebaut werden – ein Prozess, der Mitophagie genannt wird. Das Ziel dieser experimentellen Arbeit besteht darin, den Einfluss von *Tsc1/2*-Defizienz induzierter mTORC1-Überaktivierung auf die Dynamik und den Abbau von Mitochondrien in neuronalen Modellen der TSC zu untersuchen. Die folgende Haupthypothese wurde dazu aufgestellt: *„Gestörte Autophagie in der TSC führt zur Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien im Zentralnervensystem mit potenziell schwerwiegenden Auswirkungen auf die neuronale Entwicklung“*.

Um die mitochondriale Dynamik zu untersuchen, wurden neuronale Modelle der Tuberösen Sklerose, wie hippocampale oder kortikale Neuronen der Ratte, *Tsc1<sup>CC</sup>;Syn1<sup>Cre</sup>* Mäuse und iPSC (induced pluripotent stem cell)-derivierte kortikale Neuronen von Patienten mit genetisch gesicherten *TSC1* oder *TSC2* Mutationen verwendet. Eine Kombination von genetischen und biochemischen Methoden, sowie verschiedene Mikroskopietechniken wurde eingesetzt um Masse, Funktion, Transport und den Abbau von Mitochondrien, sowie das Ansprechen auf die pharmakologische Stimulation von Autophagie *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Diese Arbeit zeigt eine starke Erhöhung der mitochondrialen Masse in *Tsc2*-defizienten Neuronen, die mit neuronaler Reifung weiter zunahm, während die zentralen Transkriptionsfaktoren für die mitochondriale Biogenese unverändert oder sogar reduziert waren. Gleichzeitig wiesen Axone eine Reduktion von Mitochondrien auf, was auf eine Akkumulation im Zellkörper hinwies. Die verbliebenen axonalen Mitochondrien zeigten morphologische Auffälligkeiten und funktionale Defizite hinsichtlich des mitochondrialen Membranpotentials und der Atmungskette. Weiterhin stellte sich heraus, dass die Reduktion von axonalen Mitochondrien, infolge eines erhöhten retrograden Transports von

geschädigten Mitochondrien, die mitochondriale Verfügbarkeit an präsynaptischen Endigungen verminderte. Um die Defizite der mitochondrialen Dynamik zellulären Degradationssignalwegen zuzuordnen, wurde der mitochondriale Abbau im Detail untersucht. Es zeigte sich eine Störung der Rekrutierung von Autophagosomen und Lysosomen zu depolarisierten Mitochondrien in *Tsc2*-defizienten Axonen, sowie eine Einschränkung des globalen mitochondrialen Flux. Eine ausführliche Untersuchung der Dynamik von Autophagosomen zeigte eine Akkumulation von Autophagosomen in neuronalen Zellkörpern, eine signifikante Reduktion der Rekrutierung von Autophagosomen zu beschädigten Mitochondrien, sowie eine Abnahme der Fusion mit Lysosomen. Gleichzeitig waren die Proteinkonzentrationen der stromaufwärts liegenden Komponenten, einschließlich zentraler Mitophagiemarker, sowie wichtiger Komponenten des Autophagiesignalwegs *in vitro* und *in vivo* erhöht, was einen Block des mitochondrialen Flux durch Störungen in den späten Stadien des Autophagiesignalwegs bestätigte. Interessanterweise, war die Anzahl von Lysosomen im *Tsc2*-defizienten Status signifikant reduziert, was auf einen Defekt der lysosomalen Biogenese oder einen Verbrauch von existierenden Autolysosomen hindeutet. Pharmakologische Modulation mit Rapamycin oder Carbamazepin erwies sich als hinreichend um viele der beobachteten Defekte in den untersuchten Modellen zu korrigieren und insbesondere axonale Mitochondrien, einschließlich derer, die präsynaptische Endigungen unterstützen, wieder aufzufüllen. Beide Behandlungen waren in der Lage, Mitophagie wiederherzustellen und führten zu einem Abbau beschädigter Mitochondrien.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit Hinweise für Störungen mitochondrialer Funktion in TSC-Defizienz induzierter mTOR-Überaktivität in neuronalen *in vitro* und *in vivo* Modellen und identifiziert neue therapeutische Angriffspunkte zur Minderung mitochondrialer Dysfunktion in der Tuberösen Sklerose.