

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Volkmann

**Die Rolle der clathrin- und dynaminabhängigen Endozytose bei der
Internalisation von anti-Amphiphysin-Autoantikörpern im Falle des Stiff-
Person-Syndroms, untersucht am Zellkulturmodell hippocampaler
Neurone**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christoph Emmerich

aus Groß-Umstadt

Würzburg, September 2019

Referent: Fr. Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Koreferent: Fr. Prof. Dr. med. habil. rer. nat. Carmen
Villmann

Dekan: Hr. Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2020

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

I. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	STIFF PERSON-SYNDROM	1
1.2	AMPHIPHYSIN	5
1.3	CLATHRIN VERMITTELTE ENDOZYTULOSE	6
1.4	ENDOZYTOTISCHE AUFNAHMEMECHANISMEN VON PATHOGENEN	9
1.5	SMALL MOLECULE INHIBITOREN	10
1.5.1	<i>Allgemein</i>	10
1.5.2	<i>MiTTMMAB</i>	11
1.5.3	<i>Dyngo[®] 4a</i>	11
1.5.4	<i>pitstop[®] 2</i>	12
1.6	SMALL INTERFERING RNA (siRNA) VERMITTELTE RNA-INTERFERENZ	13
1.7	FRAGESTELLUNG	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	TIERE	18
2.2	PRÄPARATION EMBRYONALER HIPPOCAMPI VON E18 MÄUSEN	18
2.3	ZELLKULTUR PRIMÄRER EMBRYONALER HIPPOCAMPALER NEURONE	19
2.4	SMALL MOLECULE INHIBITOREN	20
2.4.1	<i>Zytotoxizitätsassay mit MiTTMMAB</i>	20
2.4.2	<i>Zytotoxizitätsassay mit pitstop[®] 2</i>	21
2.4.2.1	<i>Clathrin-inhibition mittels pitstop[®] 2</i>	21
2.4.3	<i>Zytotoxizitätsassay von Dyngo[®] 4a</i>	21
2.4.3.1	<i>Dynamin Inhibition mittels Dyngo[®] 4a</i>	22
2.5	QUANTITATIVE VERIFIZIERUNG DER SMALL-MOLECULE INHIBITOR AKTIVITÄT MITTELS FM-DYE KONTROLLE	22
2.6	GEN-KNOCKDOWN MITTELS siRNA-TRANSFEKTION	23
2.6.1	<i>Generelle Aspekte</i>	23
2.6.2	<i>Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect[®]</i>	23
2.6.3	<i>Etablierung der siRNA-Transfektion mittels N-TERTM</i>	25
2.6.4	<i>Etablierung der siRNA-Transfektion mittels GenMute[®]</i>	26
2.7	RNA-AUFREINIGUNG AUS HIPPOCAMPALLEN ZELLKULTUREN	27
2.8	REVERSE TRANSKRIPTION	27
2.9	QUANTITATIVE REAL TIME PCR	28
2.10	IMMUNZYTOCHEMIE	28
2.11	MIKROSKOPIE UND ANALYSE	29

2.12	STATISTISCHE ANALYSE	30
2.13	LIFE CELL IMAGING	30
2.14	IGG-AUFREINIGUNG	30
2.15	KOPPLUNG HUMANER ANTI-AMPHIPHYSIN ANTIKÖRPER AN QDOTS®655	31
2.16	MATERIAL	32
2.16.1	<i>Zellkultur</i>	32
2.16.2	<i>Qdot®</i>	32
2.16.3	<i>Small-molecule Inhibitoren</i>	33
2.16.4	<i>siRNA-Transfektion</i>	33
2.16.5	<i>RNA Aufreinigung, Reverse Transkription</i>	34
2.16.6	<i>qPCR Primer</i>	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	QDOT® GEKOPPELTE ANTI-AMPHIPHYSIN ANTIKÖRPER ZEIGEN ANLAGERUNG AN NEURONALE STRUKTUREN NACH SECHS STUNDEN INKUBATIONSZEIT	35
3.2	SMALL-MOLECULE INHIBITOREN	37
3.2.1	<i>Die small-molecule Inhibitoren pitstop®2 und Dyngo® 4a induzieren keine zytotoxischen Effekte in primären hippocampalen Neuronen</i>	37
3.2.2	<i>Zytotoxische Nebeneffekte durch den Dynamininhibitor MiTMAB®</i>	38
3.2.3	<i>Reduzierte FM-dye Aufnahme zwei Stunden nach der Inhibition mit den small-molecule Inhibitoren pitstop®2 und Dyngo® 4a</i>	40
3.2.4	<i>Reduzierte Aufnahme von anti-Amphiphysin-Antikörpern nach vorhergehender Dynamamin-Inhibition mit Dyngo® 4a</i>	42
3.2.5	<i>Vermehrte Aufnahme der anti-Amphiphysin Antikörper nach Clathrin-Inhibition mit pitstop®2</i>	43
3.3	ETABLIERUNG DER siRNA-TRANSFEKTION	44
3.3.1	<i>Etablierung der cell-death siRNA-Transfektion mittels HiPerFect®</i>	45
3.3.2	<i>Zytotoxischer Effekt des Transfektionsreagenz HiPerFect®</i>	47
3.3.3	<i>Etablierung der cell death siRNA-Transfektion mit N-TER™</i>	51
3.3.4	<i>Hinweise auf reduzierte Genexpression der MAP-Kinase 1 durch siRNA Knockdown mit dem Transfektionsreagenz GenMute®</i>	53
4	DISKUSSION	55
4.1	DISKUSSION DER SMALL-MOLECULE INHIBITOR- UND FM-DYE VERSUCHE	56
4.1.1	<i>Alternative Endozytosewege infolge der Inhibition von Clathrin oder Dynamamin</i>	56
4.1.2	<i>Die Rolle von Dynamamin und Clathrin bei der Internalisierung der AAK</i>	57

4.1.3	<i>Interpretation der unterschiedlich gesteigerten Endozytose nach Dynamin- und Clathrin-Inhibition zu späten Zeitpunkten</i>	58
4.1.4	<i>Keine spezifische Blockade der CME durch pitstop[®]2 und Dyngo[®]4a</i>	59
4.1.5	<i>Etablierung des siRNA knockdown</i>	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
8	TABELLENVERZEICHNIS	74

1 Einleitung

1.1 Stiff Person-Syndrom

Das Stiff Person-Syndrom (SPS) ist eine im Jahr 1956 erstmals beschriebene neurologische Erkrankung autoimmuner Genese (Moersch and Woltman, 1956). Mit einer Prävalenz von 1-2 Fällen pro 1 Mio. und einer Inzidenz von 1 Fall je 1 Mio. Einwohner pro Jahr ist es eine seltene Erkrankung (Dalakas, 2009). Die führende Symptomatik des SPS besteht aus Muskelsteifheit und intermittierend auftretenden Muskelspasmen mit Betonung der Rumpfmuskulatur und der proximalen Extremitätenabschnitte (Meinck and Thompson, 2002). Bei den betroffenen Patienten kann es daher zum charakteristischen Erscheinungsbild einer Hyperlordose der Lendenwirbelsäule kommen (Hadavi et al., 2011). Unter dem Einfluss von Stressfaktoren wie plötzlich auftretenden Geräuschen, Berührungen, oder emotionalem Stress, können einschließende Muskelspasmen auftreten (Meinck and Thompson, 2002). Daneben können andere autoimmun bedingte Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Basedow, eine Hashimoto Thyreoiditis, eine Vitiligo, eine perniziöse Anämie oder eine Zöliakie mit dem SPS assoziiert sein (Alexopoulos and Dalakas, 2010). Neben den motorischen Symptomen leiden die Patienten auch unter neuropsychologischen Symptomen wie Angst, oder Depressionen (Henningesen et al., 1996). Diese setzen sich aus realen Ängsten, z.B. vor Stürzen aufgrund der motorischen Beeinträchtigung und genereller Angststörungen zusammen, die Teil der Erkrankung und nicht reaktiv sind (Ameli et al., 2005) .

Das SPS tritt sowohl idiopathisch als auch sekundär paraneoplastisch im Rahmen von Tumorerkrankungen auf. Mit dem Syndrom sind verschiedene Autoantikörper (AAK) vergesellschaftet. Beim häufigeren, idiopathischen Auftreten des SPS werden häufig AAK gegen die Glutamat-Decarboxylase Isoform 65 gebildet (GAD-65) (Solimena et al., 1988). GAD-65 ist ein präsynaptisch lokalisiertes Enzym, das die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobuttersäure (GABA), einem an inhibitorisch wirkenden (GABAergen) Synapsen vorkommenden Neurotransmitter katalysiert. Es wird vermutet, dass

es durch Bindung der AAK an GAD-65 zu einer verminderten Synthese von GABA und folglich zu einer reduzierten zentralen Inhibition kommt (Levy et al., 1999).

Das paraneoplastische SPS steht meist im Zusammenhang mit AAK gegen Amphiphysin (De Camilli et al., 1993, Folli et al., 1993), ein präsynaptisch lokalisiertes Protein, das am Endozytose-Mechanismus des synaptischen Vesikelzyklus beteiligt ist (s.u). Beschrieben wurde das Auftreten dieser Form von AAK im Zusammenhang mit einem Mammakarzinom und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (Rosin et al., 1998, De Camilli et al., 1993).

Neben den genannten sind weitere Antigene bekannt, die Ziele von AAK darstellen und mit dem SPS in Verbindung stehen (Abb. 1).

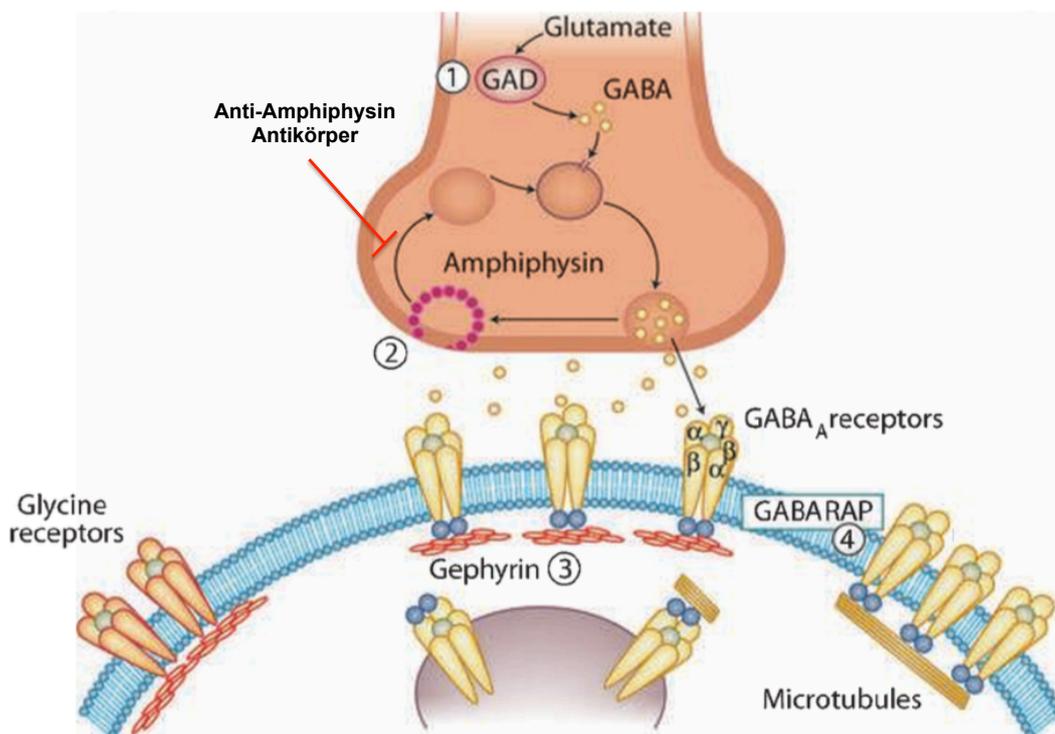


Abb. 1 Angriffspunkte der Autoantikörper beim SPS

1-4 zeigt die Antigene der Antikörper des SPS. GAD (1) ist verantwortlich für die GABA-Synthese in der Präsynapse und spielt eine Rolle bei der Befüllung präsynaptischer Vesikel mit GABA. Die Interaktion der AAK mit der SH3 Domäne des Amphiphysins (2) führt zur Störung der Vesikel-Rückgewinnung nach der GABA Freisetzung. Für jeden folgenden Zyklus stehen weniger Vesikel zur Beladung mit GABA zur Verfügung. Das Ergebnis ist eine reduzierte GABA Freisetzung. Antikörper gegen Gephyrin (3) und GABARAP (4) führen möglicherweise zu Störungen der GABAergen Transmission im Bereich der postsynaptischen GABA-Rezeptoren (adaptiert von Alexopoulos and Dalakas, 2010).

Die AAK sind dabei vorwiegend gegen postsynaptische Proteine, wie das GABA-A Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) und Gephyrin, ein Strukturprotein inhibitorischer Postsynapsen, gerichtet (Raju et al., 2006, Butler et al., 2000, Prior et al., 1992). Außerdem wird bei Fällen mit paraneoplastischem SPS in 12% der Fälle die 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 4 als Zielantigen von AAK beschrieben, die pathophysiologische Bedeutung ist aber noch unklar (Dinkel et al., 2002).

In einigen vorhergehenden Arbeiten konnten Hinweise darauf erbracht werden, dass die anti-Amphiphysin AAK im paraneoplastischen SPS einen direkten pathologischen Effekt ausüben (Werner et al., 2016, Geis et al., 2011, Geis et al., 2010, Sommer et al., 2005). In Anbetracht der klinischen Symptome, der experimentellen Befunde und des guten symptomatischen Ansprechens der Patienten mit SPS auf die Therapie mit Benzodiazepinen (Lorish et al., 1989), kann man auf eine AAK-induzierte verminderte GABAerge Inhibition als Ursache der Symptome schließen.

Der systemische passive Transfer hochtitriger IgG Fraktionen eines betroffenen Patienten mit AAK gegen Amphiphysin führte zu typischen SPS-Symptomen bei Ratten (Sommer et al., 2005). In einem weiteren Tiermodell mit intrathekalem passiven-Transfer der pathogenen AAK konnte weiterhin eine durch die AAK herbeigeführte Reduktion der spinalen GABAergen Inhibition gezeigt werden (Geis et al., 2010). Dies wurde durch elektrophysiologische Messungen belegt, die als Beispiel für einen monosynaptischen Reflexbogen den Hoffmann-Reflex untersuchten. In der Kontrollgruppe wurde die H-Antwort bei der Hochfrequenzstimulation komplett supprimiert, da diese unter Normalbedingungen bei ansteigender Reizintensität durch inhibierende Einflüsse unterdrückt wird (Lee et al., 2005). In der Versuchsgruppe mit Applikation von AAK gegen Amphiphysin fand sich dagegen eine reduzierte Hemmung der H-Antwort nach Hochfrequenzstimulation.

Aufgrund des komplexen Zusammenspiels von agonistisch und antagonistisch wirkenden Muskeln wurden polysynaptische Reflexbahnen untersucht. Im Fokus stand dabei die präsynaptische Inhibition. Hierzu wurden Hinterwurzelpotentiale abgeleitet nach dem eine Einzel- bzw.

Mehrfachstimulation präsynaptischer Neurone erfolgte. Hier fand sich bei den mit den AAK behandelten Tieren eine signifikante Verkleinerung der Hinterwurzelpotentiale, welche ebenfalls auf eine reduzierte GABAerge Inhibition zurückgeführt wird (Geis et al., 2010). Analysen der Vesikeldichte in spinalen Terminalen dieser behandelten Tiere zeigten auch eine Reduktion der Vesikel sowie der Clathrin-gebundenen Vesikel nach Stimulation. Weitergehende Untersuchungen in kultivierten Neuronen nach Behandlung mit anti-Amphiphysin AAK mittels super-resolution Mikroskopie belegten eine Stimulus-abhängige verfrühte Depletion des Reservepools präsynaptischer Vesikel (Werner et al., 2016).

In der Therapie des SPS kommen unterschiedliche Verfahren zur Anwendung (Espay and Chen, 2006). Aufgrund der autoimmunen Genese besteht die Behandlung aus immunmodulierenden Substanzen wie Glukokortikoiden (Meinck and Thompson, 2002) oder intravenöser Gabe von Immunglobulinen (ivIgG) (Amato et al., 1994), eine Alternative stellt die Plasmapheresebehandlung dar (Vicari et al., 1989). Klinisch kommt es im Fall von SPS-Patienten mit AAK gegen Amphiphysin unter der Reduktion der Antikörper-Titer durch eine Plasmapheresebehandlung zur Verbesserung der Symptome (Wessig et al., 2003). Im paraneoplastischen Fall ist die Behandlung des zugrundeliegenden Malignoms eine wichtige Säule der Therapie (Murinson and Guarnaccia, 2008).

Ergänzende physiotherapeutische Maßnahmen und eine symptomatische medikamentöse Therapie sind ebenfalls Bestandteile der multimodalen Behandlungsstrategie.

Neben der Identifikation des Antigens (Folli et al., 1993) konnten anhand des paraneoplastischen SPS mit AAK gegen Amphiphysin die sog. Koch-Witebsky Kriterien (Rose and Bona, 1993) für die autoimmune Genese einer Erkrankung gezeigt werden.

Lange Zeit war es unklar, ob AAK gegen ein primär intrazelluläres Antigen einen direkten pathogenen Effekt ausüben und auf welchem Weg sie ihr

Antigen erreichen (Kissel and Elble, 1998). Kolokalisationsstudien von humanen AAK gegen Amphiphysin mit präsynaptischen Markern wie VGAT, VGLUT, Clathrin und Bassoon sowie mit Calnexin, einem intrazellulären Marker (Geis et al., 2010), stützen die These, dass im Falle des paraneoplastischen SPS die AAK in die Zellen internalisiert werden. Über welchen Weg die AAK in das Zellinnere gelangen ist bisher unklar.

1.2 Amphiphysin

Amphiphysin ist ein vorwiegend intrazellulär lokalisiertes Protein, das an der Clathrin-vermittelten Endozytose (clathrin-mediated-endozytosis, CME) beteiligt ist (Wigge and McMahon, 1998). Es existieren zwei Isoformen: Amphiphysin I kommt vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) vor, während Amphiphysin II ubiquitär exprimiert ist (Di Paolo et al., 2002). Beide Isoformen besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau und werden durch verschiedene Domänen charakterisiert (Wu et al., 2009). Dazu gehören vom N-terminalen Ende beginnend eine α -Helix-Domäne, eine N-Bin-Amphiphysin-Rvs-(BAR)-Domäne, eine prolinreiche Domäne (PRD), eine Clathrin und AP2 bindende Domäne (CLAP) und am C-terminalen Ende eine Src-homologe Domäne 3 (SH3) (Wu et al., 2009). Diese Domänen unterscheiden sich funktionell und ermöglichen die Interaktion mit zahlreichen anderen Proteinen (Abb. 2), die an der CME beteiligt sind. Mittels der N-terminalen BAR Domäne ist Amphiphysin in der Lage die Krümmung der Membran zu detektieren und sie zu verstärken (Peter et al., 2004). Über seine PRD interagieren Amphiphysin I und II mit der SH3 Domäne von Endophilin I (Micheva et al., 1997). Dieses erfüllt zahlreiche Aufgaben während des Vorganges der Endozytose. Es ist an der Initiierung der CME beteiligt, indem es als Kalziumsensor agiert. Es spielt zum frühen Zeitpunkt der Zellmembran-Einstülpung eine Rolle und vermittelt das als „uncoating“ bezeichnete Ablösen des Clathrin-Mantels von den synaptischen Vesikeln durch die Rekrutierung von Synaptojanin (Chen et al., 2003, Verstreken et al., 2003, Gad et al., 2000). Über seine CLAP Domäne bindet Amphiphysin I an die schwere Kette von Clathrin (McMahon et al., 1997). Mittels der SH3 Domäne interagiert Amphiphysin mit Dynamin (David et al., 1996). Dabei dient Amphiphysin I der Rekrutierung von Dynamin und der Stimulation dessen

GTPase Aktivität (Takei et al., 1999, Shupliakov et al., 1997) als Voraussetzung für das Abschnüren der Clathrin ummantelten Einstülpungen (Clathrin coated pits, CCP) von der Zellmembran durch Dynamin (Marsh and McMahon, 1999). Interessanterweise sind AAK gegen Amphiphysin ebenfalls gegen den Bereich der C-terminalen Domäne gerichtet (David et al., 1994). Es konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass durch Mikroinjektionen von SH3 Domäne spezifischen Peptiden eine Beeinträchtigung der synaptischen Vesikelendozytose (SVE) durch eine verminderte Ummantelung von membranständigen Vesikeln entsteht. Die fehlende Ummantelung führt durch eine gestörte Abschnürung der Vesikel zu einem Stau von vesikulären Vorläuferstrukturen an der präsynaptischen Membran (Shupliakov et al., 1997). Neben der Beteiligung an der SVE gibt es Hinweise darauf, dass Amphiphysin ebenfalls an der Regulation der Aktinpolymerisierung und damit am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt ist. Außerdem spielt es bei der Phagozytose eine Rolle (Yamada et al., 2007, Mundigl et al., 1998).

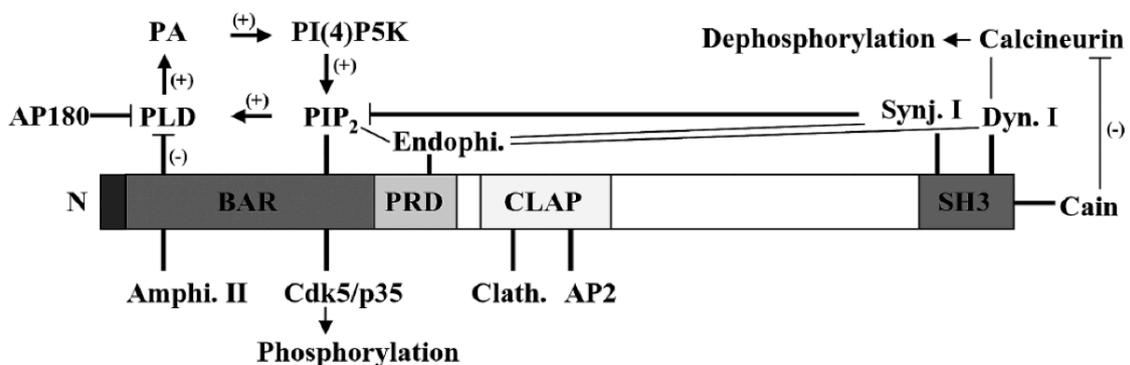


Abb. 2 Struktureller Aufbau von Amphiphysin I

Amphiphysin I besteht aus vier Domänen. Über diese interagiert es direkt, oder indirekt mit zahlreichen Proteinen der Endozytosemaschinerie (Adaptiert von(Wu et al., 2009).

1.3 Clathrin vermittelte Endozytose

Bei der Endozytose unterscheidet man Clathrin-abhängige (clathrin mediated endocytosis, CME) und einige Clathrin-unabhängige Endozytose-Mechanismen (Clathrin independent endocytosis, CIE) (Abb. 3). Die CME bei Neuronen grenzt sich in ihren Mechanismen klar von der CME anderer Zelltypen ab. Bei der

CME werden Moleküle über sogenannte Clathrin-ummantelte-Vesikel (Clathrin-Coated-Vesicles, CCV) aufgenommen. Die Bildung dieser CCV verläuft dabei in fünf Schritten: „Nucleation“ - Initiierung der Membraneinschnürung, „Cargo selection“ - Auswahl der zu ladenden Moleküle, „Coat assembly“ - Zusammenfügen des Clathrinmantels, „Scission“ - Ablösen des Vesikels von der Membran und „Uncoating“ - Ablösen des Clathrinmantels vom Vesikel (Schmid and McMahon, 2007, Kaksonen et al., 2005).

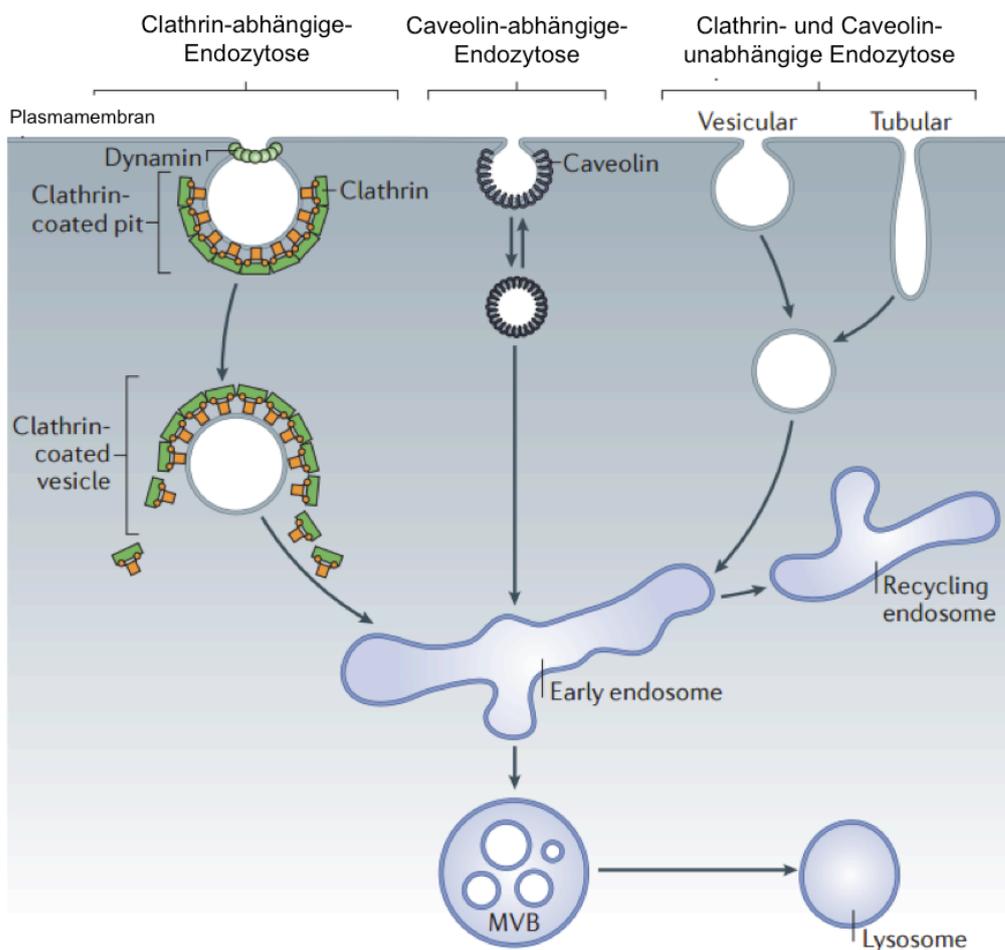


Abb. 3 Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytosemechanismen

Neben der Clathrin-abhängigen-Endozytose (s. links) existieren ebenso Clathrin-unabhängige Mechanismen zur Aufnahme von Molekülen in das Zellinnere (s. mitte und rechts) (Angepasst von McMahon and Boucrot, 2011).

1. „Nucleation“: Im ersten Schritt binden FCH domain only (FCHO) Proteine an einer Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-reichen Zone der Plasmamembran und rekrutieren das EGFR pathway substrate 15 (EPS15) und Intersectine zum sogenannten „nucleation module“. Dieses markiert den Bereich der Plasmamembran an dem in der Folge die Einschnürung zum CCV beginnt (Henne et al., 2010, Stimpson et al., 2009).

2. „Cargo selection“: Im zweiten Schritt rekrutieren die Proteine des mutmaßlichen „nucleation module“ das Adapterprotein AP-2 (Henne et al., 2010), welches mit anderen frachtspezifischen Adapterproteinen die Auswahl der Fracht vermittelt. Dazu bindet AP-2 über seine μ - und σ -Untereinheiten an das intrazellulär gelegene Ende von Transmembranrezeptoren. Der Adapterproteinkomplex AP-2 bindet über weitere Adapterproteine auch indirekt an die Fracht (Kelly et al., 2008, Collins et al., 2002).

3. „Coat assembly“: Die Rekrutierung von Clathrin erfolgt durch AP-2 und weitere Adapterproteine (Boucrot et al., 2010). Die Polymerisierung von Clathrin zu Hexagonen und Pentagonen dient der Bildung der Clathrin-Ummantelung um das sich abschnürende Vesikel und dient zur strukturellen Stabilisierung dessen Form.

4. „Vesicle scission“: Die Rekrutierung von Dynamin erfolgt durch Proteine wie Amphiphysin, Endophilin und Sorting Nexin 9 (SNX9). Diese enthalten BAR-Domänen und besitzen eine Affinität zum Halsbereich des sich ausbildenden Vesikels (Ferguson et al., 2009, Wigge et al., 1997). Sie besitzen eine SH3 Domäne mit der sie in der Lage sind, an die PRD von Dynamin zu binden (Wigge et al., 1997). Es folgt die Polymerisierung von Dynamin um den Vesikelhals, welche die GTPase Aktivität begünstigt (Sweitzer and Hinshaw, 1998, Hinshaw and Schmid, 1995) und über eine Konformationsänderung zur Abspaltung des Vesikels führt (Bashkirov et al., 2008, Roux et al., 2006, Stowell et al., 1999, Sweitzer and Hinshaw, 1998).

5. „Uncoating“: Im letzten Schritt, dem Uncoating, kommt es zum Ablösen des Clathrin-Mantels vom endozytierten Vesikel. Vermittelt durch das Protein heat shock cognate 70 (HSC70) und seinem Cofaktor Auxillin (Ungewickell et al., 1995, Schlossman et al., 1984), lösen sich die Clathrinmoleküle aus ihren Verbindungen und stehen als Einzelmoleküle für den nächsten Zyklus der CCV-Bildung zur Verfügung. Außerdem von Bedeutung für das „Uncoating“ ist die Interaktion zwischen Synaptojanin und Endophilin (Verstreken et al., 2003).

Die CME erfüllt vielfältige Funktionen. Dazu zählt die Versorgung der Zellen durch die Aufnahme von Nährstoffen wie dem low-density-lipoprotein (LDL) (Anderson et al., 1977) und dem eisenhaltigen Transferrin (Hopkins et al., 1985) nach deren Bindung an den jeweiligen membranständigen Rezeptor. Die Regulation der Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche dient der Kontrolle unterschiedlicher Signalwege (Sorkin and Von Zastrow, 2009).

Eine weitere wichtige Aufgabe neben der synaptischen Transmission ist deren Aufrechterhaltung durch das Recycling synaptischer Vesikel zum Wiederauffüllen des Vesikelpools (Grant and Donaldson, 2009, De Camilli and Takei, 1996, Heuser and Reese, 1973). Der Transport von Zellmembran-Bestandteilen zum Abbau in den Lysosomen dient der Regeneration der Zellmembran. Auch Pathogene nutzen die Prozesse der Endozytose um die Zellmembran zu überwinden s.u.

1.4 Endozytische Aufnahmemechanismen von Pathogenen

Diversen Pathogenen dient die CME als Zugangsweg in das Zellinnere. Toxine wie das Anthrax-, Tetanus-, Shiga-, Diphtherie-, oder das Botulinum Toxin B erreichen mittels der CME ihr Ziel (Deinhardt et al., 2006, Abrami et al., 2003, Sandvig et al., 1989, Morris et al., 1985). Für das Botulinumtoxin Typ A ist ein Dynamin-abhängiger Aufnahmemechanismus beschrieben (Harper et al., 2011). Neben Bakterien wie z.B. *Listeria monocytogenes* (Veiga and Cossart, 2005) stellt die CME auch für zahlreiche Viren die Eingangspforte dar. So überwinden 60% der Influenza A Viren (Rust et al., 2004) und das Hepatitis-C-Virus über CME die Zellmembran (Blanchard et al., 2006).

Neben der CME spielen jedoch auch clathrin-unabhängige Endozytosemechanismen eine Rolle in der Aufnahme von Pathogenen in das Zellinnere (Romer et al., 2007, Skretting et al., 1999).

Antikörper, deren Antigen sich intrazellulär befindet, stehen ebenso vor dem Hindernis der Zellmembran. Diese muss überwunden werden, damit potentiell pathogene Antikörper ihr Antigen erreichen und einen Effekt ausüben können. Diverse Zugangswege von Antikörpern in das Innere der Zellen stehen dabei seit Jahren zur Diskussion. Eine These geht davon aus, dass Rezeptoren für die Fc-Region der Immunglobuline der Klasse G (FcγR) am Eindringen der Antikörper in die Zellen beteiligt sind (Alarcon-Segovia et al., 1979).

An einer epithelialen Zellreihe, COLO-16, konnten nach der Inkubation mit dem entsprechenden Serum (Positiv auf antinukleäre Antikörper vom Typ IgG) von an systemischem Lupus erythematodes erkrankten Patienten mittels indirekter Immunfluoreszenz die IgG Antikörper intranukleär nachgewiesen werden (Golan et al., 1993).

Ob die CME an der Aufnahme von AAK gegen Amphiphysin beteiligt ist, ist eine der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit.

1.5 Small molecule Inhibitoren

1.5.1 Allgemein

Small-molecule Inhibitoren sind Moleküle, welche aufgrund ihrer geringen Größe von $< 800 \text{ g/mol}^{-1}$ die Fähigkeit besitzen die Zellmembran zu überwinden und ins Zellinnere einzudringen. Dort üben sie ihren inhibitorischen Effekt auf eine Funktion ihres spezifischen Ziel-Proteins aus (Weiss et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden drei small-molecule Inhibitoren verwendet. MiTMAB™ (Quan et al., 2007) und Dyngo® 4a (Mccluskey et al., 2013) als Inhibitoren des Proteins Dynamin und pitstop®2, ein Inhibitor des Proteins Clathrin (Von Kleist et al., 2011). Ihre Angriffspunkte an den jeweiligen Zielproteinen sind in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt.

1.5.2 MiTMAB™

MiTMAB™ (myristoyl trimethyl ammonium bromide, Abcam, Cambridge, UK) ist ein small-molecule Inhibitor der GTPase von Dynamin I und II. Seine inhibitorische Wirkung erzielt MiTMAB™ durch das Eingreifen in die Interaktion zwischen Dynamin und den Phospholipiden der Zellmembran an der Pleckstrin-Homologie Domäne (PH-Domäne) von Dynamin (Quan et al., 2007). Die Rekrutierung von Dynamin zur Zellmembran wird somit unterbunden. Dadurch wird im Falle des Dynamin I die synaptische Vesikel-Endozytose in Neuronen und im Falle von Dynamin II die Rezeptor-vermittelte Endozytose nicht-neuronaler Zellen gehemmt (Quan et al., 2007).

1.5.3 Dyngo® 4a

Dyngo® 4a (Abcam) ist ein small-molecule Inhibitor, welcher die GTPase Funktion von Dynamin I und II blockiert (Mccluskey et al., 2013). Dynamin I vermittelt hauptsächlich die SVE in Neuronen, indem es durch seine GTPase Aktivität eine Konformationsänderung durchläuft und dadurch zur Abschnürung der Vesikel von der Membran führt (Sweitzer and Hinshaw, 1998). Dynamin II ist für die Abschnürung von Vesikeln nicht neuronaler Zellen verantwortlich (Mccluskey et al., 2013). Dyngo® 4a ist als Weiterentwicklung ein Analogon zu dynasore®, einem weiteren Dynamin-Inhibitor (Macia et al., 2006). Im Vergleich zu diesem verfügt Dyngo® 4a über eine 37-fach höhere Potenz bzgl. seiner mittleren inhibitorischen Konzentration (IC 50), eine geringere Zytotoxizität und eine reduzierte Lösungsmittel-interaktion (Mccluskey et al., 2013). Unter dem Einfluss von Dyngo® 4a konnte eine verringerte SVE in neuronalen Zellkulturen, eine reduzierte Endozytose von Transferrin und eine erniedrigte Internalisierung von Botulinum Toxin A gezeigt werden (Mccluskey et al., 2013, Harper et al., 2011). Eine 15 minütige Inkubation von cerebellären Körnerzellkulturen mit Dyngo® 4a in einer Konzentration von 30 µM führte außerdem zu einer reduzierten Aufnahme des lipophilen Membranfarbstoffs FM1-43 (Mccluskey et al., 2013).

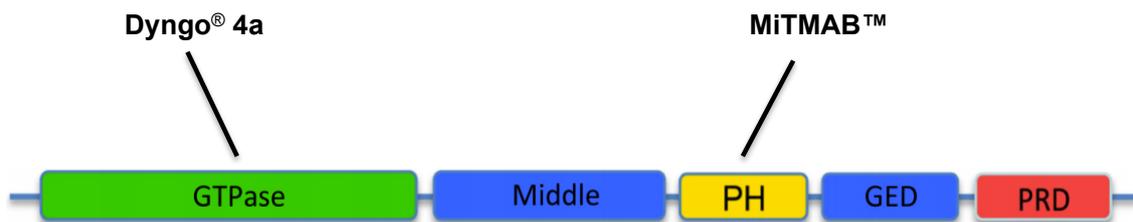


Abb. 4 Angriffspunkte der small molecule Inhibitoren an der Domänenstruktur von Dynamin

MiTMAB[™] inhibiert die Rekrutierung von Dynamin zur Zellmembran durch die Interaktion mit dessen PH-Domäne. Dyngo[®] 4a interagiert mit der GTPase Domäne und blockiert damit deren Funktion, die für die Konformationsänderung des Dynamin und der daraus resultierenden Vesikelabschnürung essentiell ist (adaptiert von Sundborger u. Hinshaw 2014).

1.5.4 pitstop[®]2

Pitstop[®]2 (Abcam) ist ein amphiphiler, spezifischer Inhibitor der CME mit unwesentlicher Beeinträchtigung der Zellvitalität (Von Kleist et al., 2011). Der Inhibitor setzt an der terminalen Domäne (TD) von Clathrin an und verhindert über eine kompetitive Inhibition den Zugang diverser Adapterproteine, wie AP-1, AP-2 und anderer Helfer-Proteine zur TD (Von Kleist et al., 2011). Die Folge ist eine gestörte Vesikelendozytose. Für Clathrin-vermittelte Vorgänge wie die Internalisierung von Transferrin, des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) oder des Humanen-Immundefizienz-Virus konnte unter der Verwendung von pitstop[®]2 eine reduzierte Aufnahme gezeigt werden (Von Kleist et al., 2011).

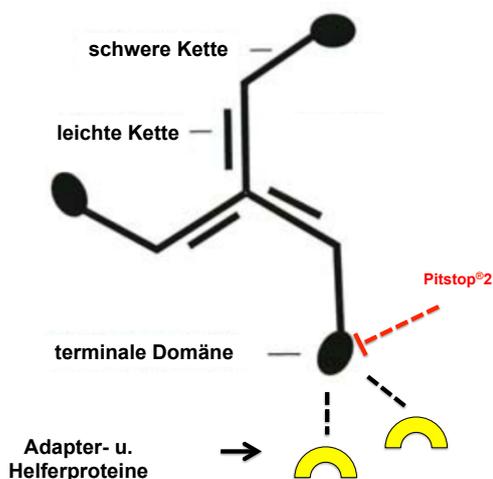


Abb. 5 Inhibition der Clathrin TD durch pitstop[®]2

Die typische Struktur von Clathrin als Trimer mit je drei leichten und schweren Ketten, an deren Ende sich die TD befindet. Pitstop[®]2 inhibiert kompetitiv die Bindung von Adapter- und weiteren Helferproteinen an der TD (adaptiert von (Mousavi et al., 2004).

1.6 Small interfering RNA (siRNA) vermittelte RNA-Interferenz¹

Die Manipulation der Genexpression gelang lange Zeit v.a. durch die Herstellung transgener Organismen. Die Nachteile dieser Methodik sind der große methodische Aufwand und die transgenen Tiere, die häufig nicht oder eingeschränkt lebensfähig sind. Alternative Möglichkeiten Gene zu supprimieren sind die Verwendung von Ribozymen, katalytisch aktiven RNA-Molekülen, oder antisensen Oligonukleotiden. Letztere sind Einzelstrang-DNA-Moleküle, die mit der mRNA interagieren und zu deren Degradierung führen. Im Vergleich hierzu liegt der Vorteil einer posttranskriptionellen Gensuppression mittels exogen in die Zellen eingebrachter small-interfering RNA (siRNA) in den weniger stark ausgeprägten unspezifischen Nebeneffekten durch eine deutlich geringere benötigte Konzentration.

Die Erstbeschreibung der spezifischen Gen-regulierenden Wirkung kurzer Doppelstrang-RNA Moleküle (dsRNA) konnte am Modellorganismus des Fadenwurms *C.elegans* gezeigt werden (Fire et al., 1998). Anschließend wurde diese Funktion ebenfalls bei Säugern beschrieben (Hannon, 2002). Die sog. microRNA (miRNA) ist dabei endogenen Ursprungs, entgegen der experimentell verwendeten exogen zugeführten siRNA (Davidson et al., 2004). Die RNAi dient neben der Genregulation bei Pflanzen und Insekten ebenfalls der Abwehr von Fremd-DNA, beispielsweise im Rahmen von Virusinfektionen (Agrawal et al., 2003).

Einige Zellen und Zelllinien sollten sich im Verlauf der weiteren siRNA Erforschung als schwer transfizierbar herausstellen. Bis heute stellen u.a. primäre Zellkulturen (Dalby et al., 2004) und Neurone eine Herausforderung dar (Krichevsky and Kosik, 2002). Aufgrund der geringeren Toleranz dieser Zellarten gegenüber Veränderungen ihres umgebenden Milieus (Karra and Dahm, 2010), geht der Versuch die Genexpression von extern zu manipulieren

¹ Grundlagen des folgenden Abschnittes entstammen Hermey, Mahlke, Schwake, Sommer, „Der Experimentator-Neurowissenschaften“. Heidelberg : Spektrum akademischer Verlag; 2010: Kapitel 2.11

häufig mit erhöhtem Zelltod einher (Lv et al., 2006). Überleben die Zellen die Transfektion zeigt sich häufig nur eine gering ausgeprägte Gensuppression (Dalby et al., 2004). Das Prinzip der RNA Interferenz ist in Abb. 6 dargestellt. Voraussetzung für die Genregulation mittels RNAi ist das Vorhandensein einer dsRNA (Elbashir et al., 2001). Diese kann bei Säugern aus einer genkodierte Vorläufer-dsRNA, einer viralen dsRNA, oder aus molekularbiologischer Herstellung stammen (Lam et al., 2015). Die dsRNA wird durch eine spezielle RNase, Dicer genannt, prozessiert (Bernstein et al., 2001). Dicer sind Enzyme, die mit der dsRNA über eine dsRNA bindende Domäne (dsRBD) interagieren und mittels zweier RNase III Domänen eine 21-23 Basenpaar (bp) lange dsRNA, mit einem 3' Überhang von zwei Nukleotiden aus dem Vorläufermolekül erzeugen (Meister and Tuschl, 2004). Der RNA induced silencing complex (RISC) (Hammond et al., 2000) setzt sich aus mehreren Proteinen zusammen. Dicer, das HIV-1 TAR RNA binding protein (TRBP) und Argonaute 2 (Ago2) vermitteln die Bindung der dsRNA, ihre Spaltung zur Einzelstrang RNA (ssRNA), und das Abstoßen des passenger Stranges (Macrae et al., 2008). Das Ago2 wird durch den am RISC gebundenen Führungsstrang zur komplementären mRNA geleitet. Mittels seiner PIWI Domäne spaltet Ago2 die mRNA zwischen dem 10. und 11. Nukleotid der siRNA (Tomari and Zamore, 2005). Die Fragmente der gespaltenen mRNA werden anschließend über Exonucleasen abgebaut (Orban and Izaurralde, 2005) und die Translation der durch die mRNA kodierten Proteine dadurch inhibiert. Der RISC steht daraufhin für die Spaltung weiterer mRNA Moleküle zur Verfügung.

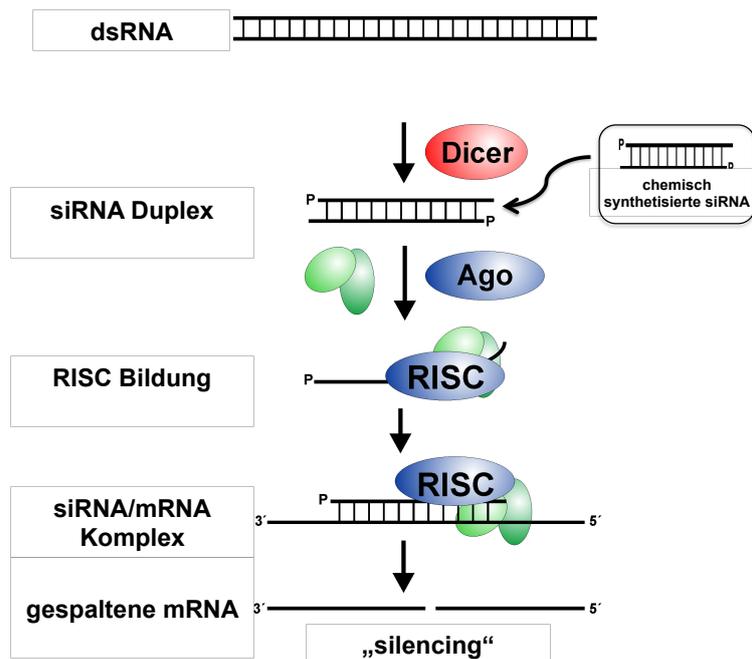


Abb. 6 siRNA vermittelter Gen-knockdown

Eine dsRNA wird durch das Enzym Dicer in 21-23 bp lange dsRNA Moleküle mit einem 3' Überhang von zwei Nucleotiden gespalten. Bei der anschließenden Bildung des RISC wird ein Strang des siRNA Duplex abgespalten und der am RISC befindliche Führungs-Strang bindet an eine komplementäre mRNA. Die gebundene mRNA wird durch den RISC gespalten und die Synthese des darauf kodierten Proteins inhibiert. Das Gen wurde dadurch „stillgelegt“ (silencing) (adaptiert von gene-quantification.de).

Faktoren, die die Effizienz der Gensuppression beeinflussen sind u.a. der zu transfizierende Zelltyp, die Zelldichte und die Proteinstabilität (Mcmanus and Sharp, 2002). Auch die Konzentration der verwendeten siRNA spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich möglicher zytotoxischer Effekte (Fedorov et al., 2006).

Da siRNA-Moleküle aufgrund ihrer Größe (>10 kD) und der negativen Ladung nicht membrangängig sind, ist es nötig auf Hilfsmittel bei der Überwindung der Zellmembran zurückzugreifen. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten das Einschleusen der siRNA herbeizuführen. Man unterscheidet physikalische-, wie die Elektroporation und Mikroinjektion, von chemischen Methoden, wie der Verwendung von kationischen Lipiden. Diese bilden mit der siRNA einen elektrisch neutralen Komplex und können über Endozytose aufgenommen werden (Abb. 7).

Die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien unterscheiden sich in ihren Wirkungsmechanismen. HiPerFect® (Qiagen, Hilden, Germany) ist eine Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden. Das N-TER™ Transfektionssystem (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) verspricht aufgrund seines peptidbasierten Transfektionsreagenz eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zu den lipidbasierten Varianten. GenMute® (tebu-bio, Offenbach, Germany) soll durch seine „pH-dependent conformational Change“ (PDCC) Technologie zu stabileren liposomalen siRNA Komplexen führen und eine höhere Transfektionsrate erzielen.

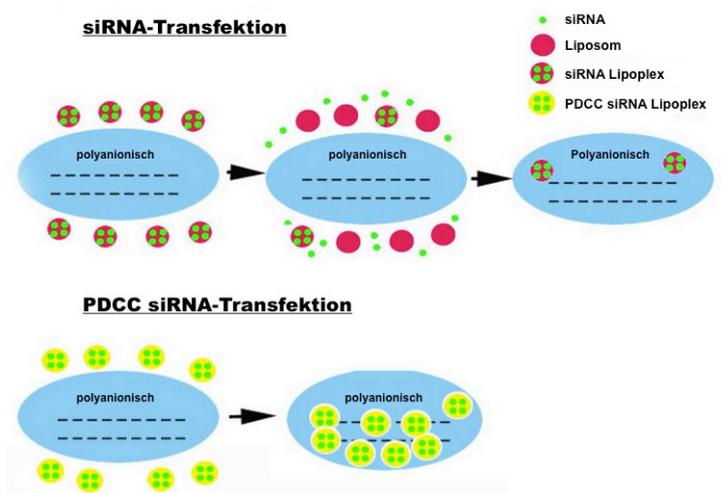


Abb. 7 Prinzip der siRNA Transfektion

Im oberen Teil ist das Prinzip der lipidbasierten siRNA-Transfektion dargestellt. Die siRNA bildet zusammen mit den Liposomen des Transfektionsreagenz den siRNA Lipoplex, welcher die polyanionische Zellmembran überwinden kann. Die „pH dependent conformational technology“ (PDCC), bei der den Liposomen zusätzliche hydrophobe Gruppen hinzugefügt wurden, ermöglicht die Stabilisierung der siRNA Lipoplexe in einer virusähnlichen Größe. Diese Eigenschaften ermöglichen eine höhere Transfektionsrate (adaptiert von signagen.com).

1.7 Fragestellung

Aus den Hinweisen auf die pathogenetischen Effekte der AAK gegen Amphiphysin im Falle des SPS und der gezeigten Kollokalisierung mit intrazellulären Proteinen ex-vivo und in-vitro (Werner et al., 2016, Geis et al., 2011, Geis et al., 2010, Sommer et al., 2005) ergibt sich die Frage, auf welchem Weg die Antikörper ihr Zielantigen erreichen. Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation molekularer Mechanismen für die Internalisierung potentiell pathogener AAK am Zellkulturmodell primärer hippocampaler Neurone. Im Vordergrund steht die Blockade des Clathrin-vermittelten Endozytosevorganges mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen. Small-molecule Inhibitoren dienen der direkten Blockade von Proteinen, die eine zentrale Rolle im Endozytosemechanismus einnehmen. Als weitere experimentelle Herangehensweise auf genetischer Ebene wird mittels siRNA-Transfektion versucht die Expression dieser Endozytoseproteine zu unterdrücken. Um die Funktionsfähigkeit der small-molecule Inhibitoren zu verifizieren wurden Internalisierungsversuche mit FM-dye, einem lipophilen Marker für Zellmembranen, durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Zur Gewinnung der hippocampalen Neurone wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 aus der hauseigenen Zucht der Tierhaltung des Kopfklinikums der Universität Würzburg verwendet. Sie wurden bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in Standardkäfigen gehalten. Die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr erfolgte ad libitum. Die Zucht und die Verwendung der Mäuse erfolgten gemäß den Richtlinien des Universitätsklinikums und nach Genehmigung der Regierung von Unterfranken.

2.2 Präparation embryonaler Hippocampi von E18 Mäusen

Zur Präparation der embryonalen Hippocampi wurden Mäuseembryonen am 18. Embryonaltag (E18) verwendet. Die trächtigen Muttertiere wurden nach Betäubung mit Isofluran (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), durch cervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke wurde mit einer Präparationsschere (FST, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) eröffnet und die Embryonen dem Uterus entnommen. Die Embryonen wurden nach der Extraktion aus der Eihaut dekapitiert und die Köpfe in eine Petrischale mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 50 ml 10xHBSS, 1 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), 3,5 ml 1 mM HEPES[®], mit sterilem Wasser auf 500 ml aufgefüllt) überführt. Unter dem Binokular (Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erfolgte die Exzision der Hippocampi beider Hemisphären nach folgenden Schritten:

Mit einer Pinzette (FST) wurde in occipito-frontaler Richtung in die Kopfhaut eingestochen und diese nach lateral abgezogen. Das gleiche geschah mit der Schädelkalotte. Das Gehirn wurde in toto aus dem Schädel entfernt indem man die Pinzette von lateral kommend unter den frontalen Pol des Gehirns platzierte und es von dort nach hinten aus dem Schädel herauslöste.

Die beiden Hemisphären wurden mit einem Skalpell (FST) durch einen senkrechten Schnitt entlang des Sulcus sagittalis superior voneinander

getrennt. Die Meningen wurden mittels einer Pinzette von der Gehirnoberfläche abgelöst um eine möglichst reine neuronale Zellkultur zu erhalten. Dazu wurde das Gehirn am Bulbus olfactorius mit einer Pinzette fixiert und die Hirnhäute von der Cortexoberfläche entfernt. Auch die mediale Hirnoberfläche wurde von meningealem Gewebe befreit.

Zur Entnahme des Hippocampus wurde ein Skalpell von caudal unter den Hippocampus geführt, dieser nach cranial weggeklappt und vom umliegenden Gewebe abgetrennt. Die Fimbrien und anhaftenden Cortexanteile wurden entfernt. Die Isolation und Kultivierung der enthaltenen hippocampalen Zellen erfolgte im Anschluss (s.u.).

2.3 Zellkultur primärer embryonaler hippocampaler Neurone

Die in einer mit HBSS gefüllten Petrischale gesammelten Hippocampi wurden zum Verdau der extrazellulären Matrix mit einer Pipette (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) mit 2%iger Trypsinlösung pipettiert und für fünf Minuten im Wasserbad (Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Die Trypsinlösung wurde entfernt und die Hippocampi zweimal mit HBSS gewaschen um die Aktivität des Verdauungsenzyms zu stoppen. Nach der Entfernung des HBSS wurde Neurobasal-Medium (100 ml Neurobasal + 1% Glutamin + 1% Pen/Strep + 2% B27) hinzugegeben (bei bis zu 4 Hippocampi: 1 ml; bei 5 oder mehr: 2 ml).

Die Dissoziation der Neurone erfolgte über Scherkräfte beim auf- und abpipettieren mit einer Glas-Pasteurpipette (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland), deren Öffnungslumen zuvor mit Hilfe eines Gasbrenners verkleinert wurde. Die Zellzahl in der gewonnenen Suspension wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde eine 1/20- Verdünnung der Zellen mit HBSS (45 µl) und Trypan-Blau 0,4% hergestellt. 10 µl dieser Verdünnung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop (Zeiss) wurden 4 Quadranten der Neubauer-Zählkammer bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt und mittels folgender Formel die Zellzahl pro Milliliter ermittelt:

$$N \times 10^4 \times d/4 = \frac{\text{cells}}{\text{ml}}$$

N= ermittelte Summe der Zellzahl aus vier Quadraten der Neubauer-Kammer
d= Verdünnung der Zellsuspension

Aus der ermittelten Gesamtzahl wurde die Menge an Zellsuspension errechnet, die je Glas-coverslip für die gewünschte Zelldichte nötig war. Die verwendeten Glas-coverslips mit einem Durchmesser von 12 mm wurden zuvor autoklaviert, vorbereitet und mit einer Pinzette in die entsprechenden Zellkulturplatten (4-Well, 24 Well) übertragen. Dort wurden 150 µl Poly-D-Lysin auf jeden Glas-coverslip pipettiert und die Zellkulturplatten im Inkubator (37°C, 5% CO₂) für eine Stunde inkubiert. Mit einer Vakuumpumpe (A. Hartenstein) wurde das überschüssige Poly-D-Lysin abgezogen. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Glas-coverslips über Nacht zum Trocknen unter der Sterilbank belassen.

Für alle Versuche mit den small molecule Inhibitoren wurden 30000 Neurone in 150 µl Medium je Poly-D-Lysin beschichtetem Glas-coverslip (ø12mm, A. Hartenstein) ausgesät. Im Rahmen der siRNA Experimente wurden 50000 Neurone ausgesät. Zum Anwachsen der Zellen wurden die Coverslips über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% Co₂ belassen. Zur Kultivierung wurden am Folgetag zusätzlich 350µl Neurobasalmedium hinzugegeben. Für die Experimente kamen die primären hippocampalen Neurone nach zehn Kulturtagen in vitro (DIV 10) zur Verwendung.

2.4 Small molecule Inhibitoren

2.4.1 Zytotoxizitätsassay mit MiTMAB™

Der Dynamininhibitor MiTMAB™ (Abcam, Cambridge, UK) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Zur Etablierung der optimalen Konzentration des Inhibitors wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Jeweils zwei Glas-coverslips wurden mit 5 µM, 10 µM und 30 µM MiTMAB™ in 200 µl Medium

inkubiert. Nach 1 h bzw. 6 h wurde die MiTMAB™ Lösung durch Neurobasalmedium ersetzt. Die morphologische Analyse der Neurone mit Hilfe eines Durchlicht-Mikroskops (Olympus IX70, 20-fache Vergrößerung, analySIS® Software) wurde 6 h nach Inhibitionsbeginn, bei 20-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 500 µs vorgenommen.

2.4.2 Zytotoxizitätsassay mit pitstop®2

Zur Beurteilung der Zytotoxizität des Clathrin-Inhibitors pitstop®2 (Abcam, Cambridge, UK) erfolgte die Inkubation von hippocampalen Neuronen (DIV 10) mit einer Konzentration von 15 µM. Die Verdünnung von pitstop®2 erfolgte nach Herstellerangaben. Die Inkubationszeit wurde zwischen 5 und 30 min variiert, (2 Glas-coverslips je Gruppe). Die Inkubation der hippocampalen Neurone mit pitstop®2 erfolgte im Inkubator (37°C, 5% CO₂). Unter dem Durchlichtmikroskop (Olympus) erfolgte für jede Gruppe sechs Stunden nach Beginn der Inkubation mit pitstop®2 die morphologische Beurteilung der hippocampalen Neurone.

2.4.2.1 Clathrin-inhibition mittels pitstop®2

Die hippocampalen Neurone (DIV10) wurden für 10 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator mit 15 µM pitstop®2-Lösung in 200 µl Medium präinkubiert. Die pitstop®2-Lösung wurde durch 200 µl einer Lösung von Amphiphysin-, oder Kontrollantikörpern in einer Konzentration von 25 ng/µl für eine Inkubationszeit von sechs Stunden ersetzt. Die weitere Prozessierung erfolgte gemäß des unter 2.10 genannten Färbeprotokolls.

2.4.3 Zytotoxizitätsassay von Dyngo® 4a

Zur Beurteilung der Zytotoxizität des Dynamin-Inhibitors Dyngo® 4a (Abcam, Cambridge, UK) erfolgte die Inkubation der hippocampalen Neurone (DIV 10) im Inkubator (37°C, 5% CO₂) für 20 Minuten mit 30 µM in 200 µl Medium (Harper et al., 2011). Die Verdünnung von Dyngo® 4a erfolgte nach Herstellerangaben. Die morphologische Beurteilung der hippocampalen

Neurone erfolgte mit Hilfe des Durchlicht-Mikroskops (Olympus) sechs Stunden nach Inkubationsbeginn.

2.4.3.1 Dynamin Inhibition mittels Dyngo[®] 4a

Hippocampale Neurone (DIV 10) wurden mit Dyngo[®] 4a in einer Konzentration von 30 μ M in 200 μ l Medium für 20 min im Inkubator (37°C, 5% CO₂) präinkubiert. Diese Dyngo[®] 4a Lösung wurde durch 200 μ l einer Lösung von Amphiphysin-, oder Kontrollantikörpern in einer Konzentration von 25 ng/ μ l für eine Inkubationszeit von sechs Stunden ersetzt. Die weitere Prozessierung erfolgte gemäß des unter 2.10 genannten Färbeprotokolls.

2.5 Quantitative Verifizierung der small-molecule inhibitor Aktivität mittels FM-dye Kontrolle

Die Effektivität des Endozytoseblocks durch pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a wurde in einem separaten Experiment überprüft. Primäre hippocampale Neurone wurden mit small-molecule Inhibitoren präinkubiert (s.o.: 15 μ M pitstop[®]2 für 10 Minuten; 30 μ M Dyngo[®] 4a für 20 Minuten). Zur Steigerung der Endozytoserate wurden die Zellen mit einer kaliumreichen Lösung (NaCl 39 mM, Glucose 30 mM, HEPES 25 mM, KCL 90 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM) eine Minute lang stimuliert. 980 μ l der Stimulationslösung wurden 20 μ l FM[®] 1-43FX hinzugegeben. Die Stimulation erfolgte zwei und sechs Stunden nach Abschluss der Präinkubationszeit der small-molecule Inhibitoren. Mit 37°C warmer artificial-cerebrospinal-fluid-Lösung (ACSF, NaCl 125 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucose 25 mM, KCL 2,5 mM) wurden die Zellen für fünf Minuten gewaschen. Zur Fixation wurden die hippocampalen Neurone mit Paraformaldehyd 4% (PFA) bei Raumtemperatur (RT) für 15 Minuten inkubiert. Die Einschlussimmobilisierung erfolgte mit Mowiol[®] 4-88 (Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland) und Dapi (4',6'-Diamidin-2-phenylindol, 1:1000) auf einem Objektträger.

2.6 Gen-knockdown mittels siRNA-Transfektion

2.6.1 Generelle Aspekte

Für einen siRNA-vermittelten Gen-Knockdown müssen die betreffenden siRNAs mittels einer Transfektion, hier eine chemische Transfektion, über die normalerweise impermeable Zellmembran in das Zellinnere geschleust werden. Drei Transfektionsreagenzien wurden in dieser Arbeit getestet (HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland), N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), Gen-Mute™ siRNA transfection Reagent for Neurons (SignaGen Laboratories, Gaithersburg, USA)). Alle verwendeten siRNAs wurden von Qiagen bezogen (Tab. 10). Der Transfektionserfolg wurde mit der AllStars Cell Death siRNA überprüft. Diese siRNA bindet an DNA-Sequenzen die für das Überleben der Zellen essentiell sind. Als Negativkontrolle diente die AllStars Negative Control siRNA, die laut Hersteller keine Homologie zu DNA-Abschnitten von Säugern besitzt. Die Auswertung erfolgte mittels Beurteilung der Morphologie der hippocampalen Neurone unter dem Durchlicht-Mikroskop (Olympus) 72 Stunden nach Beginn des knockdown Experiments.

2.6.2 Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect®

Für die Versuche wurden die siRNAs und das Transfektionsmedium entsprechend Tab. 1 in Neurobasalmedium verdünnt. Die Inkubation mit der siRNA und dem Transfektionsreagenz erfolgte für 72 Stunden (37°C, 5% CO₂). Die Lösung wurde dann durch Neurobasalmedium ersetzt und die Zellen morphologisch beurteilt. Entsprechend der resultierenden Ergebnisse erfolgte in Folgeversuchen die Variation der Konzentrationen der siRNA und des Transfektionsreagenz gemäß Tab. 2. In allen Versuchen wurden Mock-Kontrollen inkludiert in denen die Zellen mit den gleichen Bestandteilen inkubiert wurden wie in den tatsächlichen knockdown Versuchen jedoch ohne die entsprechende siRNA. Dies diente der Beurteilung des Einflusses des Transfektionsreagenz auf die Vitalität der Zellen unabhängig von der Verwendung der cell-death siRNA. Unbehandelte Zellen dienten dem Beweis

der erhaltenen Vitalität der Zellen ohne Einwirkung von siRNAs oder Transfektionsreagenzien.

		1	2	3	4	5	6
A	Konz. siRNA [nM]	10	10	10	10	10	10
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	5	5	5	5	5	5
	HiPerFect [μ l]	1,5	3	4,5	1,5	3	4,5
B	Konz. siRNA [nM]	5	5	5	5	5	5
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	HiPerFect [μ l]	1,5	3	4,5	1,5	3	4,5
C	Konz. siRNA [nM]	1	1	1	1	1	1
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	HiPerFect [μ l]	1,5	3	4,5	1,5	3	4,5
D	Konz. siRNA [nM]	0	0	0	0	0	0
	target	Mock-Ctrl	Mock-Ctrl	Mock-Ctrl	Nothing	Nothing	Nothing
	siRNA Stock [μ l]	0	0	0	0	0	0
	HiPerFect [μ l]	1,5	3	4,5	0	0	0

Tab. 1 Versuchsaufbau 1 zur Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect[®]

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 10nM mit 1,5 μ l, 3 μ l und 4,5 μ l HiPerFect[®] **(A1-6)**

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 5nM mit 1,5 μ l, 3 μ l und 4,5 μ l HiPerFect[®] **(B1-6)**

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 1nM mit 1,5 μ l, 3 μ l und 4,5 μ l HiPerFect[®] **(C1-6)**

Mock-Kontrolle **(D1-3)** Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung **(D 4-6)**

		1	2	3	4
A	Konz. siRNA [nM]	7,5	7,5	7,5	7,5
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	3,75	3,75	3,75	3,75
	HiPerFect [μ l]	1	2	1	2
B	Konz. siRNA [nM]	5	5	5	5
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	2,5	2,5	2,5	2,5
	HiPerFect [μ l]	1	2	1	2
C	Konz. siRNA [nM]	2,5	2,5	2,5	2,5
	target	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	Negative-Ctrl
	siRNA Stock [μ l]	1,25	1,25	1,25	1,25
	HiPerFect [μ l]	1	2	1	2
D	Konz. siRNA [nM]	0	0	0	0
	target	Mock-Ctrl	Mock-Ctrl	Nothing	Nothing
	siRNA Stock [μ l]	0	0	0	0
	HiPerFect [μ l]	1	2	0	0

Tab. 2 Versuchsaufbau 2 zur Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect[®]

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 7,5 nM mit 1 μ l und 2 μ l HiPerFect[®] (**A1-4**)

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 5 nM mit 1 μ l und 2 μ l HiPerFect[®] (**B1-4**)

Celldeath siRNA/Negativkontrolle 2,5 nM mit 1 μ l und 2 μ l HiPerFect[®] (**C1-4**)

Mock-Kontrolle (**D1-2**) Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung (**D 3-4**)

2.6.3 Etablierung der siRNA-Transfektion mittels N-TER[™]

Das N-TER Peptid, die cell-death siRNA und die negative-control siRNA wurden nach Herstellerangaben (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) in Neurobasalmedium gelöst und die hippocampalen Neurone gemäß Tab. 3 und Tab. 4 für 24 h (in weiteren Versuchen für 6 h bzw. 4 h) im Inkubator (37°C und 5% CO₂) inkubiert. 72 h nach Transfektionsbeginn erfolgte die morphologische Beurteilung mit dem Durchlicht-Mikroskop (Olympus). In allen Versuchen wurden Negativkontrollen, Mock-Kontrollen und unbehandelte Zellen inkludiert

		1	2	3	4	5	6
A	Konz. siRNA [nM]	3,5	3,5	5	5	6,5	6,5
	Ziel	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS	CellDeath_MS
	nfs Stock [μ l]	2,7	2,7	3,8	3,8	5,0	5,0
	Medium [μ l]	497,3	497,3	496,2	496,2	495,2	495,2
B	Konz. siRNA [nM]	3,5	3,5	5	5	6,5	6,5
	Ziel	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl	Negative-Ctrl
	nfs Stock [μ l]	2,7	2,7	3,8	3,8	5,0	5,0
	Medium [μ l]	497,3	497,3	496,2	496,2	495,2	495,2

Tab. 3 Versuchsaufbau zur Etablierung der siRNA-Transfektion mit N-TER[™]

		1	2
A	Konz. siRNA [nM]	0	0
	target	Mock-ctrl	Mock-ctrl
	nfs Stock [μ l]	2,7	3,8
	Medium [μ l]	497,3	496,2
B	Konz. siRNA [nM]	0	0
	target	Mock-ctrl	nothing
	nfs Stock [μ l]	5,0	0
	Medium [μ l]	495	500

Tab. 4 Mock-Kontrollen zum N-TER™ Transfektionsreagenz

Für die Mock-Kontrollen wurde die Menge der nanoparticle-formation-solution (nfs) ohne Hinzugabe der siRNA verwendet, die sonst für die entsprechende siRNA Konzentration bei regulärem Knockdown-Versuch benötigt wurde. Ergänzend wurde eine Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung angelegt.

Die weitere Etablierung erfolgte mit einer siRNA Konzentration von 2,5 nM und einer Inkubationszeit von 4 Stunden (s.Tab. 5). Als Ziel-Gen für die siRNA in den folgenden Etablierungsversuchen diene die mitogen-activated protein kinase-1 (Mm/HS_MAPK1, Qiagen). Nach vierstündiger Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und 72 Stunden nach Transfektionsbeginn die RNA-Aufreinigung (s.u.).

	1	2	3
Konz. siRNA [nM]	2,5	2,5	0
Ziel	MAPK-1	Negativ-Ctrl.	Mock-Ctrl.
nfs Stock [μ l]	1,9	1,9	1,9
Medium [μ l]	498,1	498,1	498,1

Tab. 5 Ansatz zur Etablierung der Mm/Hs_MAPK1 siRNA-Transfektion mit N-TER™

2.6.4 Etablierung der siRNA-Transfektion mittels GenMute®

Der GenMute® Transfektionspuffer, das GenMute® Reagenz, das Neurobasalmedium und die Mm/HS_MAPK1 control siRNA (5 nM) (Qiagen) wurden nach Herstellerangaben (SignaGen® Laboratories, Gaithersburg, USA) zu einem Transfektionsmedium zusammengefügt. Hippocampale Neurone wurden mit diesem Medium fünf Stunden im Inkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert und bis 72 Stunden nach Inkubationsbeginn in 500 μ l Neurobasalmedium kultiviert. Es folgte die RNA-Aufreinigung (s.u.).

2.7 RNA-Aufreinigung aus hippocampalen Zellkulturen

Zur Aufreinigung der RNA aus primären hippocampalen Neuronen wurde das RNeasy[®]-Mini-Kit (Qiagen) verwendet. Das Ablösen der Zellen vom Glas-coverslip erfolgte mechanisch mittels eines Zellschabers (A. Hartensein) nach zuvoriger Hinzugabe von RLT-Buffer inklusive β -Mercaptoethanol zur chemischen Unterstützung der Auflösung der Zellverbände und der einzelnen Zellen. Anschließend wurde das gewonnene Material auf eine spezielle Säule mit einer Membran, in der die RNA-Bestandteile aufgefangen werden, gegeben. Durch multiple Zentrifugationsschritte unter Hinzugabe unterschiedlicher Puffer-Lösungen erfolgte der Zellaufschluss um die Zellorganelle freizulegen und final die RNA zu gewinnen. Diese wurde am Ende der Prozedur mittels RNase freiem Wasser unter Zentrifugation aus der Membran der Säule herausgelöst. Es wurden jeweils vier Glas-coverslips zusammengeführt um eine ausreichende Menge an RNA zur Weiterverarbeitung in der reversen Transkription zu gewinnen. Die gewonnenen Proben wurden auf Eis gesammelt, der RNA-Gehalt und Reinheitsgrad durch Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Nanodrop[®] (Thermo Scientific, Wilmington, USA) quantitativ bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde basierend auf den Absorptionskoeffizienten von 260 nm und den Standard-Extinktionskoeffizienten bestimmt. Im Anschluss wurde die reverse Transkription (s.u.) zur Herstellung der cDNA durchgeführt, oder die Proben bei -80°C aufbewahrt.

2.8 Reverse Transkription

Es wurden 250 ng RNA in 32,8 μ l RNase freiem destilliertem Wasser eingesetzt. 5 μ l des random Hexamers (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden hinzugefügt und für 3 min. bei 85°C in einem Heizblock (A. Hartenstein) inkubiert und auf Eis gegeben. Diesem Mix wurden anschließend 2 μ l Oligo-DT und 60,2 μ l Premix bestehend aus 10 μ l 10xBuffer, 22 μ l 25 mM MgCl₂, 20 μ l dNTP, 2 μ l RNase Inhibitor und 6,2 μ l Multiscribe je Probe hinzugegeben (Alle Life Technologies GmbH). Die Proben wurden anschließend in den peq STAR 96 universal Cyler (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben.

Die Cyclor-Bedingungen für einen Zyklus lauteten wie folgt:
10 min. 25°C, 60 min. 48°C und 5 min 95°C.

2.9 Quantitative Real Time PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) wurde der Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block und die Step One™ Software (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die cDNA aus der vorhergehenden reversen Transkription wurde in einem Verhältnis von 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt, bevor sie dem Versuchsansatz hinzugefügt wurde. Das Endvolumen des Gesamtansatzes je Probe betrug 12,5 µl. Davon waren 6,25 µl iTaq™ SYBR® Green Supermix with rox (Bio-Rad Laboratoris GmbH, München, Deutschland), 1,25 µl des entsprechenden Primers (s.Tab. 12), 2,5 µl RNase-freies Wasser und 2,5 µl cDNA. Die Cyclorbedingungen gestalteten sich wie folgt:

5 min. 95°C; 40 Zyklen á 10 sek 95°C, 30 sek. 60°C, 10 sek. 95°C;
Schmelzkurven Ermittlung: 5 sek. 65°C 15 sek. 95°C

2.10 Immunzytochemie

Primäre hippocampale Neurone (DIV 10) wurden in PFA 4% für 20 Minuten bei RT fixiert. Die Glas-coverslips wurden mit einer Pinzette in eine Feuchtkammer übertragen und dreimalig mit PBS gewaschen. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei RT mit BSA/PBS 10% inklusive Triton-X 0,3%, eine weitere 20 minütige Inkubation mit BSA/PBS 2% inklusive Normal-Goat Serum 5% (NGS 5%) und ein 5 minütiges Waschen mit BSA/PBS 1%. Ziel dieser Zwischenschritte war das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen. Die Neurone wurden mit 80 µl Primärantikörperlösung (Konzentrationen s. Tab. 6) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3x für je 5 Minuten mit PBS (pH 7,4; 0,1 M) gewaschen. Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper wurden ebenfalls entsprechend der Herstellerkonzentration in BSA/PBS 2% gelöst und bei RT für eine Stunde inkubiert. Die Einschlussimmobilisation der primären hippocampalen Neurone erfolgte nach drei weiteren Waschschrirten

mit PBS. Verwendet wurde Mowiol® 4-88 in dem DAPI (1:1000), ein Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA-Molekülen und somit zur Darstellung von Zellkernen enthalten war. In einer Objektträgerbox (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) wurden die angefertigten Präparate bei 4°C über Nacht zum Aushärten belassen.

Abweichungen ergaben sich für die in den Clathrin-, und Dynamin-Inhibitionsversuchen verwendeten humanen Antikörper wie folgt:

Nach vorhergehender Manipulation des Endozytosevorganges durch die small molecule Inhibitoren (s.o.), wurden die hippocampalen Neurone mit 200 µl einer humanen Primärantikörperlösung für sechs Stunden im Inkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und für 15 Minuten bei -20°C in 100% Methanol fixiert. Das Methanol sorgt für eine Permeabilisierung der Membran und ermöglicht dem Sekundärantikörper das Erreichen seines Zielantigens. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass nach einer Fixation mit PFA 4% eine Anfärbung der humanen Primärantikörper durch den Sekundärantikörper im Gegensatz zur Methanolfixation nicht möglich war. Der restliche Ablauf entsprach dem o.g. Prozedere.

<i>Primärantikörper</i>	Konzentration	Spezies	Hersteller/Artikel Nr.
Amphiphysin	25ng/µl	Human	Aufreinigung Uniklinikum Würzburg
Kontrollantikörper	25ng/µl	Human	Aufreinigung Uniklinikum Würzburg
<i>Sekundärantikörper</i>			
Cy3 (F)	1:200	goat-anti-human	Dianova 109-165-003

Tab. 6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

2.11 Mikroskopie und Analyse

Die mikroskopischen Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen wurden mit einem Axioskop 2 (Zeiss), einer Spot4 CCD-Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) und der Spot Advanced Software (Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, USA) angefertigt.

Die fluoreszenz-mikroskopische Analyse der Antikörperaufnahme im Rahmen der Inhibitionsversuche und der Endozytoseaktivität nach FM-dye Färbung, erfolgte ebenfalls mit dem Axioskop 2 (Zeiss) bei 63-facher Vergrößerung mit einem Öl-Immersionsobjektiv. Zur Bestimmung der Endozytoseaktivität wurde ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) verwendet. Als Maß für die Stärke der Anfärbung wurde das Produkt aus der zu analysierenden Fläche und des Medians der Grauwerte derselben Fläche bestimmt.

Zur morphologischen Beurteilung der Vitalität der hippocampalen Neurone im Rahmen der Zytotoxizitätsassays der small-molecule Inhibitoren und nach der Behandlung mit der cell-death siRNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Etablierung des Gen-knockdown, wurden Bilder mit dem Durchlichtmikroskop (Olympus) angefertigt. Alle Auswertungen erfolgten verblindet.

2.12 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der small-molecule-Inhibitorversuche erfolgte mittels SigmaPlot 12 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Für die Versuche wurde entsprechend deren Aufbau die Holm-Sidak Methode angewandt. In den Graphen kommen die Mittelwerte und Standardabweichungen zur Darstellung. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus sind mit * markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.13 Life cell Imaging

Zur Bestimmung der nötigen Inkubationszeit der hippocampalen Neurone mit den anti-Amphiphysin-AAK wurden hippocampale Neurone (DIV 10) mit 2,5 μ l Q-Dot-gekoppelter anti-Amphiphysin-AAK in 200 μ l Neurobasalmedium für drei bzw. sechs Stunden inkubiert. Die Aufnahmen entstanden mit einem Axioskop 2 bei 63-facher Vergrößerung mit einem Wasserimmersions-Objektiv (Zeiss) in Krebs-Ringer-HEPES Lösung (KCL 5 mM, NaCl 140 mM, 1 M HEPES, pH 7,4 10 mM, Glucose 10 mM, CaCl_2 2,6 mM, MgCl_2 1,3 mM).

2.14 IgG-Aufreinigung.

Die Aufreinigung der verwendeten humanen anti-Amphiphysin Autoantikörper (h-aAmph-AAK) und der entsprechenden Kontrollantikörper, die in den

Inhibitionsversuchen zur Verwendung kamen, wurden vor Beginn der Dissertation von PD Dr. Andreas Weishaupt und Susanne Hellmig (beide: Universitätsklinikum Würzburg, Neurologische Klinik) durchgeführt und zur Verfügung gestellt (Geis et al., 2010).

2.15 Kopplung humaner anti-Amphiphysin Antikörper an Qdots®655

Zur Konjugation der Quantum dots (Qdots) mit den h-aAmph-AAK wurde das Qdot® 655 Antibody Conjugation Kit (Life technologies, Carlsbad, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in Zusammenarbeit mit Susanne Helmig (Kopfzentrum der Universität Würzburg). Als Ausgangsmenge der h-aAmph-AAK dienten 3 µl gelöst in 300 µl PBS.

2.16 Material

2.16.1 Zellkultur

Produkt	Menge	Hersteller	Katalog Nr.
Neurobasal	500ml	GIBCO	21103-049
Pen Strep	100ml	GIBCO	15140-122
L-Glutamin 200mM	100ml	GIBCO	25030-024
B-27 Supplement	10ml	GIBCO	17504-044
10*HBSS+ Ca ²⁺ + Mg ²⁺	500ml	GIBCO	14060-040
HEPES Buffer Solution (1M)	100ml	GIBCO	15630-056
0,05% Trypsin-EDTA	100ml	GIBCO	25300-054
Poly-D-Lysine	5mg	Sigma	P6407-5MG
Trypan blau 0,4%	100ml	Sigma	T8154-100ML
Multidish 4-Well		Nunc	176740
Multidish 24-Well		Nunc	142475
Tissue culture dish 100x20mm		Sarstedt	83.1802
Cell culture flask 25cm ²		Cellstar	690175
Bottle Top Filter		Thermo scientific	290-4520
Objekträger	50 Stk.	R.Langenbrinck	
Coverslips 12mm	100 Stk.	R.Langenbrinck	01-0012/1
Rubber policeman 230 mm, 13mm	50 Stk	A.Hartenstein	ZS 23

Tab. 7 Zellkultur

2.16.2 Qdot[®]

Produkt	Menge	Hersteller	Katalog Nr.
Qdot [®] 655 Antibody Conjugation Kit	1 Stk.	Life technologies	Q22021MP

Tab. 8 Qdot[®]

2.16.3 Small-molecule Inhibitoren

Produkt	Menge	Hersteller	Katalog Nr.
pitstop [®] 2		abcam	ab120687
Dyngo [®] 4a		abcam	ab120689
MITMAB [™]		abcam	ab120466

Tab. 9 Small-molecule Inhibitoren

2.16.4 siRNA-Transfektion

Produkt	Menge	Hersteller	Katalog Nr.
HiPerFect [®]	1ml	Qiagen	301705
N-TER [™]	400µl	Sigma	N2913-400UL
GenMute [®]	1ml	tebu-bio	SL100568-N2A
RNase free water	12 x 1,9ml	Qiagen	129112
RNAi Human/Mouse Starter Kit	1 Stk.	Qiagen	301799
AllStars Hs Cell Death siRNA	5nmol	Qiagen	SI04381048
AllStars Negative control siRNA	5nmol	Qiagen	1027280
Mm/Hs_MAPK1 control siRNA	5nmol	Qiagen	1022564

Tab. 10 siRNA-Transfektion

2.16.5 RNA Aufreinigung, Reverse Transkription

Produkt	Menge	Hersteller	Katalog Nr.
RNeasy [®] -Mini-Kit (50)	1 Stk.	Qiagen	74106
QIAshredder [™] (50)	1 Stk.	Qiagen	79654
Random Hexamer	5 nmol	Life technologies	N8080127
Oligo (dT) 50µM	5 nmol	Life technologies	N8080128
PCR Buffer II + MGCl ² 10x Sol.	1,5 ml	Life technologies	N8080010
DNTP Mix 10 mm	1 ml	Life technologies	N8080260
RNase Inhibitor 20 U/µl	1 ml	Life technologies	N8080119
Multiscribe	100 µl	Life technologies	4311235

Tab. 11 RNA Aufreinigung, Reverse Transkription

2.16.6 qPCR Primer

Zielgen	Abk.	Spezies	Hersteller	Katalog Nr.
mitogen-activated protein kinase 1	Mapk1	mouse	Qiagen, Quantitec	QT00133840
Dynamin 1	Dnm_1	mouse	Qiagen, Quantitec	QT00122339
Clathrin, heavy polypeptide	Cltc2	mouse	Qiagen, Quantitec	QT01073415
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	mouse	Qiagen, Quantitec	QT01658692
actin, beta	Actb2	mouse	Qiagen, Quantitec	QT01136772
18s RNA	Rn18s	mouse	Qiagen, Quantitec	QT01036875
Hprt	Hprt	mouse	Qiagen, Quantitec	QT00166768
heat shock factor binding protein 1	Hsbp1	mouse	Qiagen, Quantitec	QT01076488
hydroxymethylbilane synthase	Hmbs	mouse	Qiagen, Quantitec	QT00494130

Tab. 12 qPCR Primer

3 Ergebnisse

3.1 Qdot[®] gekoppelte anti-Amphiphysin Antikörper zeigen Anlagerung an neuronale Strukturen nach sechs Stunden Inkubationszeit

Quantum dots (Qdots[®]) sind fluoreszierende Nanokristalle, die an humane IgG Antikörper gegen Amphiphysin (h-aAmph-AAK), oder aus Patientenserum aufgereinigte Kontrollantikörper gekoppelt wurden. Die markierten Antikörper wurden mit lebenden primären hippocampalen Zellen inkubiert und mittels fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in-situ detektiert. Das Ziel dieses Versuchs war es herauszufinden, welche Inkubationszeit nötig ist, um eine ausreichende Aufnahme der h-aAmph-AAK durch die hippocampalen Neurone zu analysieren. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden jeweils nach ein-, drei- und sechsständiger Antikörper-Inkubation angefertigt.

Nach ein- und dreistündiger Inkubation waren keine Unterschiede im Bindungsmuster des h-aAmph-AAK im Vergleich zum Kontrollantikörper festzustellen (nicht dargestellt). In allen Gruppen war zu diesen Zeitpunkten keine differenzierte Anlagerung der Antikörper an die neuronalen Strukturen zu erkennen.

Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch ein neuronales Bindungsmuster der h-aAmph-AAK. Dieses unterschied sich deutlich vom Bindungsmuster des Kontrollantikörpers, welcher keine neuronenspezifische Bindung zeigte (s. Abb. 8). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in sämtlichen folgenden Versuchen eine Inkubationszeit der h-aAmph-AAK von sechs Stunden vor der Fixation der Zellen gewählt.

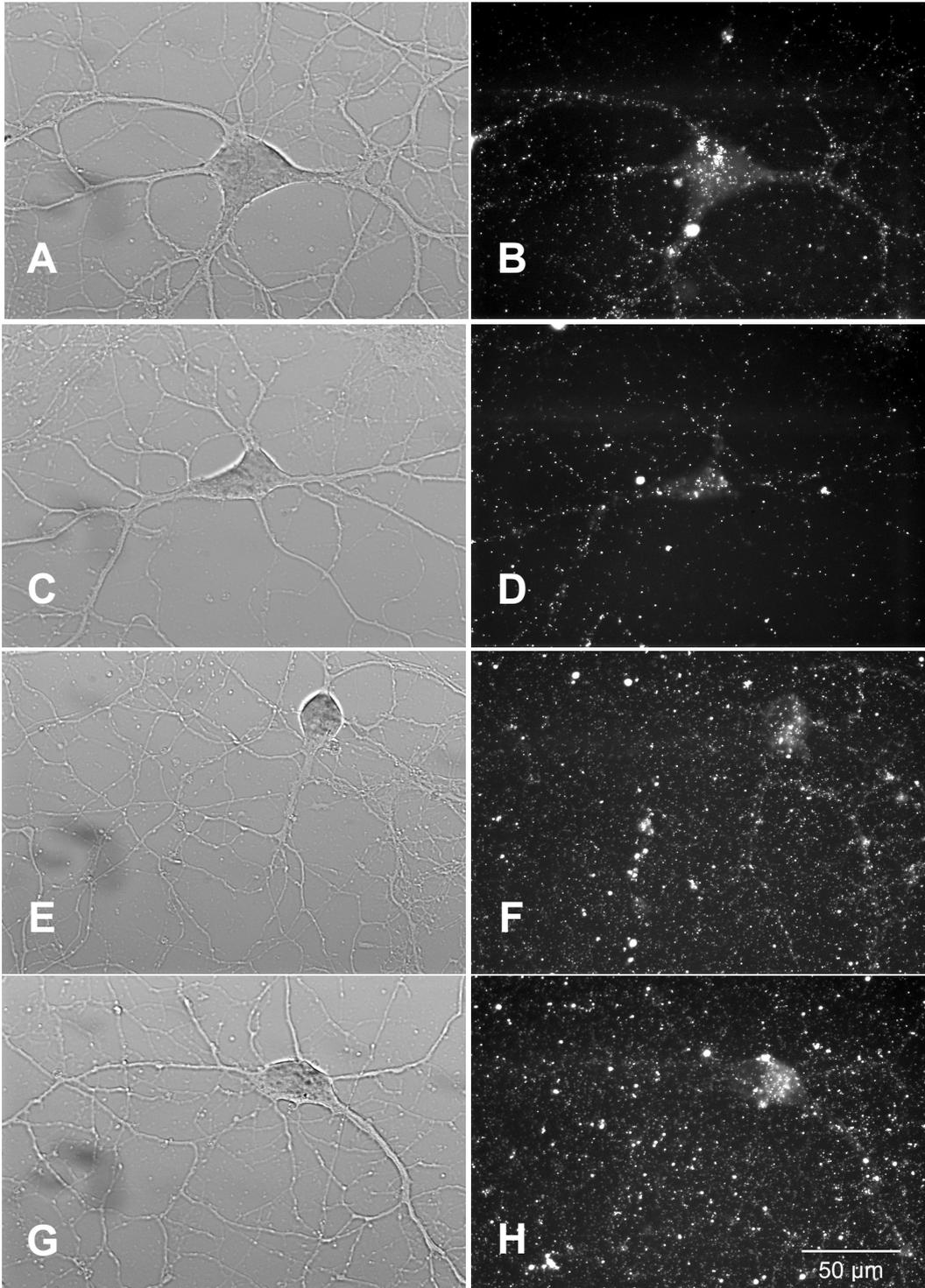


Abb. 8 Anlagerungsmuster nach sechsständiger Inkubation mit h-aAmph-AAK und einem Kontrollantikörper.

A, C, E, G zeigen lichtmikroskopische-, B, D, E, F fluoreszenzmikroskopische live-Aufnahmen nach sechs stündiger Inkubation von hippocampalen Neuronen (DIV10) mit h-aAmph-AAK (A, B, C, D) und einem Kontrollantikörper (E, F, G, H). In B und D erscheint ein an den neuronalen Strukturen angelagertes Bindungsmuster der h-aAmph-AAK. F und H zeigen hingegen ein unspezifisches Bindungsmuster.

3.2 small-molecule Inhibitoren

3.2.1 Die small-molecule Inhibitoren pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a induzieren keine zytotoxischen Effekte in primären hippocampalen Neuronen

Zur Beurteilung möglicher zytotoxischer Effekte durch den Dynamininhibitor Dyngo[®] 4a und den Clathrininhibitor pitstop[®]2 wurden primäre hippocampale Neurone (DIV10) von E18 Mäusen mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Laut Herstellerangaben war eine fünf bis zehnminütige Inkubation mit pitstop[®]2 ausreichend um eine Inhibition der Endozytoseaktivität zu erreichen. Es wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt.

In Abb. 10 ist die Morphologie von hippocampalen Neuronen nach 5-, 15- und 30 minütiger Inkubation mit pitstop[®]2 in einer Konzentration von 15 μm dargestellt. Da die in den späteren Inhibitionsversuchen durchgeführte Evaluation der Antikörperaufnahme erst nach einer Antikörper-Inkubationszeit von sechs Stunden erfolgte, wurden die Aufnahmen in Abb. 9 und Abb. 10 sechs Stunden nach Beendigung der Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor angefertigt, um eine mögliche verzögert auftretende Zytotoxizität auszuschließen.

Ein Vergleich der Morphologie zwischen den mit Dyngo[®] 4a (Abb. 9) oder pitstop[®]2 (Abb. 10) behandelten Kulturen und den entsprechenden Negativkontrollen ergab keinen Anhalt für einen zytotoxischen Effekt der untersuchten small-molecule Inhibitoren auf die Neurone.

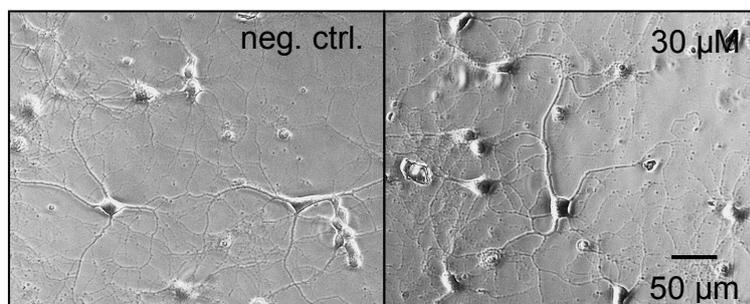


Abb. 9 Zytotoxizitätsassay mit Dyngo[®] 4a 30 μm

Primäre hippocampale Neurone (DIV10) zeigen nach 20 minütiger Inkubation mit Dyngo[®] 4a eine regelrechts Morphologie ohne Hinweis auf vermehrte Zelluntergänge.

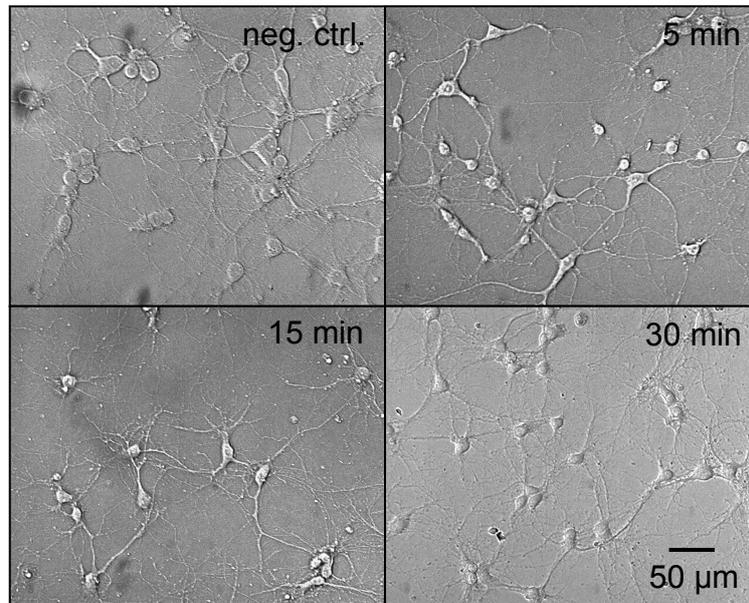


Abb. 10 Zytotoxizitätsassay mit pitstop[®]2 15 µM

Nach 5-, 15- und 30 minütiger Inkubation mit pitstop[®]2 zeigen primäre hippocampale Neurone (DIV10) eine regelrechte Morphologie ohne Hinweis auf vermehrte Zelluntergänge.

3.2.2 Zytotoxische Nebeneffekte durch den Dynamininhibitor MiTMAB[®]

Zur Etablierung der Inkubationsdauer und der tolerablen Konzentration von MiTMAB[®] wurde eine Konzentrationsreihe von 5 µM bis 30 µM bei einer Inkubationszeit von einer und sechs Stunden durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Morphologie der Neurone unter dem Durchlichtmikroskop untersucht.

Abb. 11 zeigt morphologisch unauffällige Negativkontrollen zu beiden Zeitpunkten. Eine Konzentration von 5 µM scheint nach einer und sechs Stunden Inkubation kaum Auswirkungen auf die Morphologie der Neurone zu haben. Im Vergleich dazu ist bei einer Konzentration von 10 µM und einer Inkubationsdauer von einer Stunde eine deutliche Fragmentierung der Zellen und ihrer Fortsätze festzustellen. Aufgrund dieser zytotoxischen Wirkung wurden keine weiteren Untersuchungen mit MiTMAB durchgeführt. Zur weiteren Analyse der Antikörperaufnahme wurden im Folgenden die o.g. small-molecule Inhibitoren pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a verwendet.

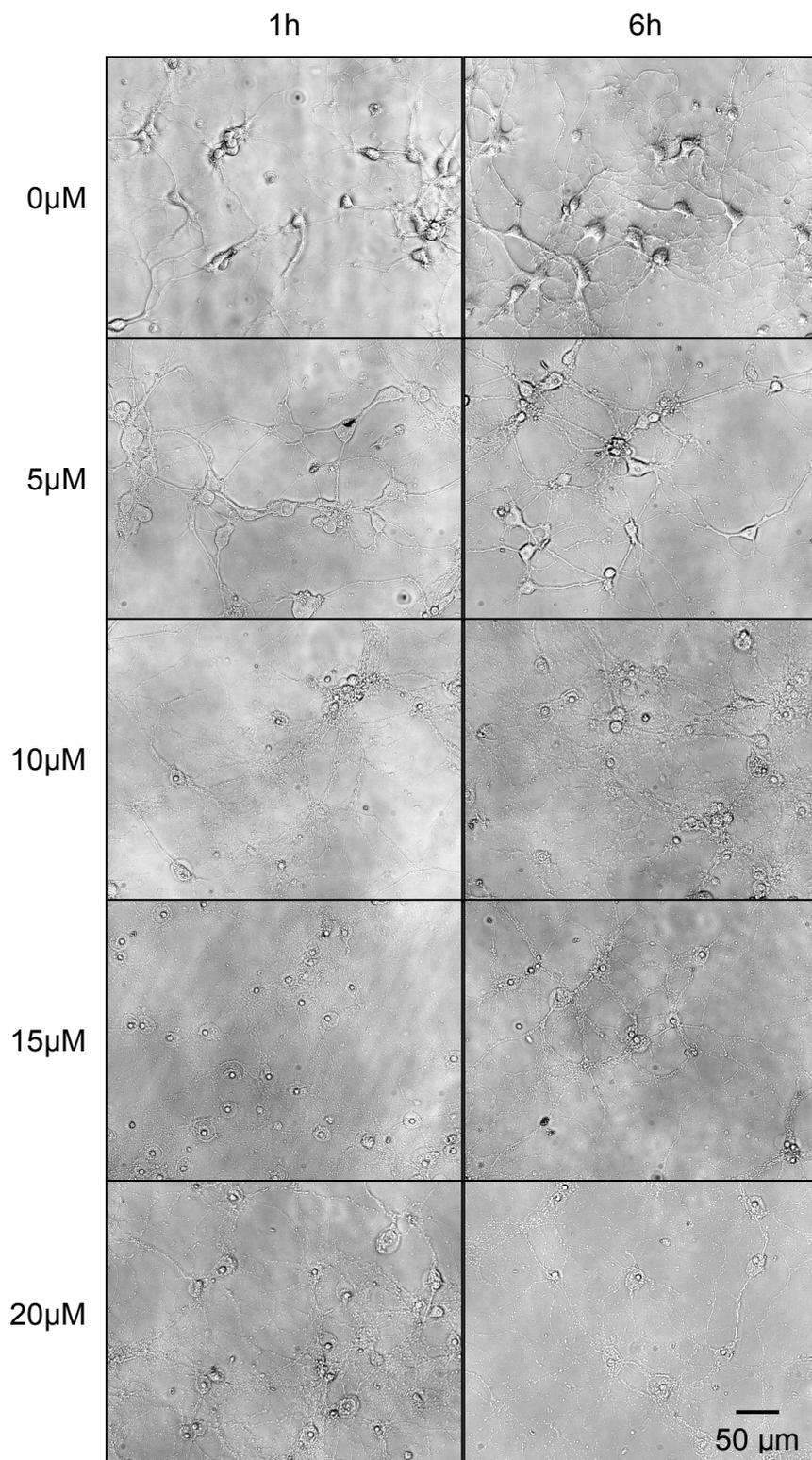


Abb. 11 Zytotoxizitätsassay mit MiTMAB®

Ab einer Konzentration von 10 µM MiTMAB® kommt es nach einer Inkubationszeit von einer und sechs Stunden zur Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze, was auf eine zytotoxische Wirkung hindeutet.

3.2.3 Reduzierte FM-dye Aufnahme zwei Stunden nach der Inhibition mit den small-molecule Inhibitoren pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a

Um eine Aussage treffen zu können ob die small-molecule Inhibitoren in den IgG-Aufnahme Experimenten ihre inhibitorische Wirkung entfalten, wurden separate Experimente mit FM-dyes durchgeführt. Primären hippocampalen Zellkulturen (DIV10) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Präinkubation mit den small-molecule Inhibitoren eine kaliumreiche Stimulationslösung mit FM-dyes hinzugegeben. Dadurch werden die FM-dyes durch Endozytose aufgenommen. Die internalisierten FM-dyes können dann durch ihre Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Zwei Stunden nach der Inkubation mit den small-molecule Inhibitoren zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch für die mit pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a behandelten Zellen ein im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant ($p < 0,001$) geringeres FM-dye Signal (Abb. 12 u. Abb. 13).

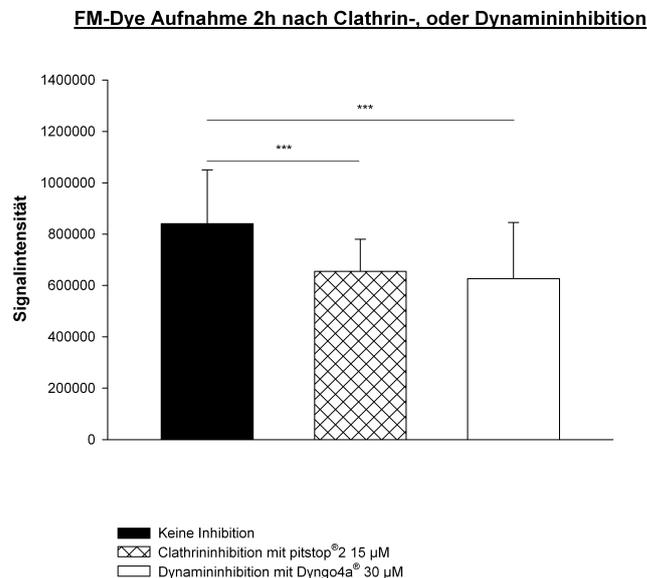


Abb. 12 FM-dye Aufnahme zwei Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition

Zwei Stunden nach der Inhibition von Clathrin durch den small-molecule Inhibitor pitstop[®]2 (N=47) und der Inhibition von Dynamin durch Dyngo[®] 4a (N=50) zeigt sich in beiden Gruppen eine signifikant reduzierte FM-dye Aufnahme in primäre hippocampale Neurone im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (N=47) (***) ($p < 0,001$; Holm-Sidak-Test).

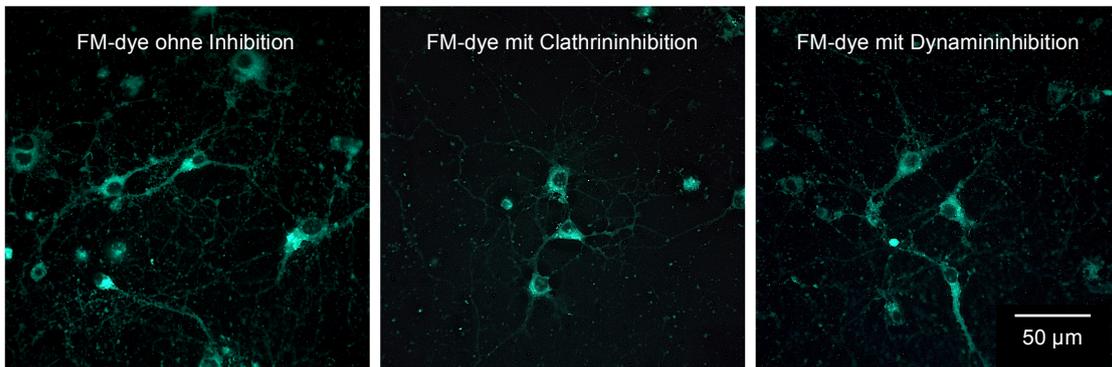


Abb. 13 FM-dye Signal zwei Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition

FM-dye Signal ohne Inhibition (links), nach Clathrininhibition (Mitte), nach Dynamininhibition (rechts). Es zeigt sich im Falle der Clathrin und Dynamininhibition ein reduziertes FM-dye-Signal zwei Stunden nach der Inhibition. Vergl. Diagramm Abb. 12

Nach sechs Stunden war das Signal der FM-dyes bei den mit pitstop[®]2 behandelten Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen signifikant stärker ($p < 0,001$). Bei den mit Dyngo[®] 4a behandelten Zellen war kein signifikanter Unterschied zu detektieren ($p=0,269$) (s.

Abb. 14 u. Abb. 15).

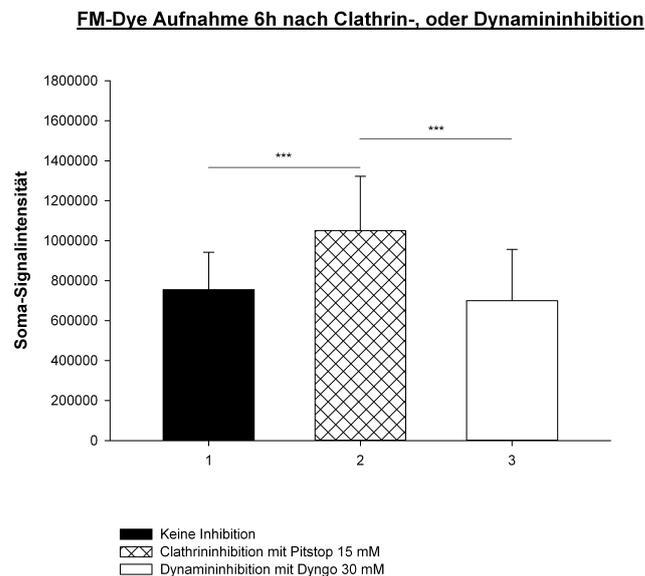


Abb. 14 FM-dye Aufnahme sechs Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition

Sechs Stunden nach der Inhibition von Clathrin durch den small-molecule Inhibitor pitstop[®]2 (N=41) zeigt sich eine signifikant vermehrte FM-dye Aufnahme in primäre hippocampale Neurone im Vergleich zu den

unbehandelten Zellen (N=36). Die Inhibition von Dynamin durch Dyngo[®] 4a (N=43) führt zu diesem Zeitpunkt zu keinem signifikanten Unterschied der FM-dye Aufnahme (***) ($p < 0,001$; Holm-Sidak-Test).

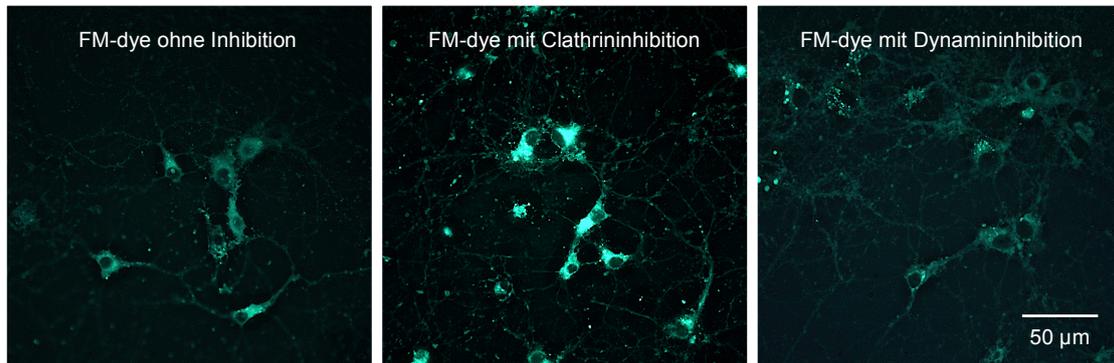


Abb. 15 FM-dye Signal sechs Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition

FM-dye Signal ohne Inhibition (links), nach Clathrininhibition (Mitte), nach Dynamininhibition (rechts).

Es zeigt sich im Falle der Clathrininhibition ein deutlich verstärktes FM-dye Signal sechs Stunden nach der Inhibition. Im Falle der Dynamininhibition zeigt sich eine leicht reduzierte Signalstärke im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibition (links). Vergl. Diagramm in Abb.14

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung der small-molecule Inhibitoren, pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a zwei Stunden nach der Inhibition überwiegt, bevor anschließend ihre Wirkung nachlässt, oder sich möglicherweise die Aktivität Clathrin-unabhängiger Endozytosewege reaktiv verstärkt.

3.2.4 Reduzierte Aufnahme von anti-Amphiphysin-Antikörpern nach vorhergehender Dynamin-Inhibition mit Dyngo[®] 4a.

Um zu testen, ob bei der Aufnahme der h-aAmph-AAK in hippocampale Neurone ein dynaminabhängiger Endozytosevorgang eine Rolle spielt, wurde dieser durch Blockade der Dynaminfunktion mit dem small-molecule Inhibitor Dyngo[®] 4a (30 μM) blockiert. Nach der Präinkubation mit Dyngo[®] 4a und der anschließenden sechsstündigen Inkubation mit den h-aAmph-AAK zeigte sich für diese Gruppe im Vergleich zur Gruppe ohne vorhergehende Dynamininhibition ein gering, aber signifikant ($p < 0,05$) vermindertes Signal über die ausgemessene Fläche hinweg (Abb. 16), was eine signifikant reduzierte Aufnahme der h-aAmph-AAK durch Blockierung der Dynaminfunktion bedeutet.

Ig-G Internalisation 6h nach Dynamininhibition

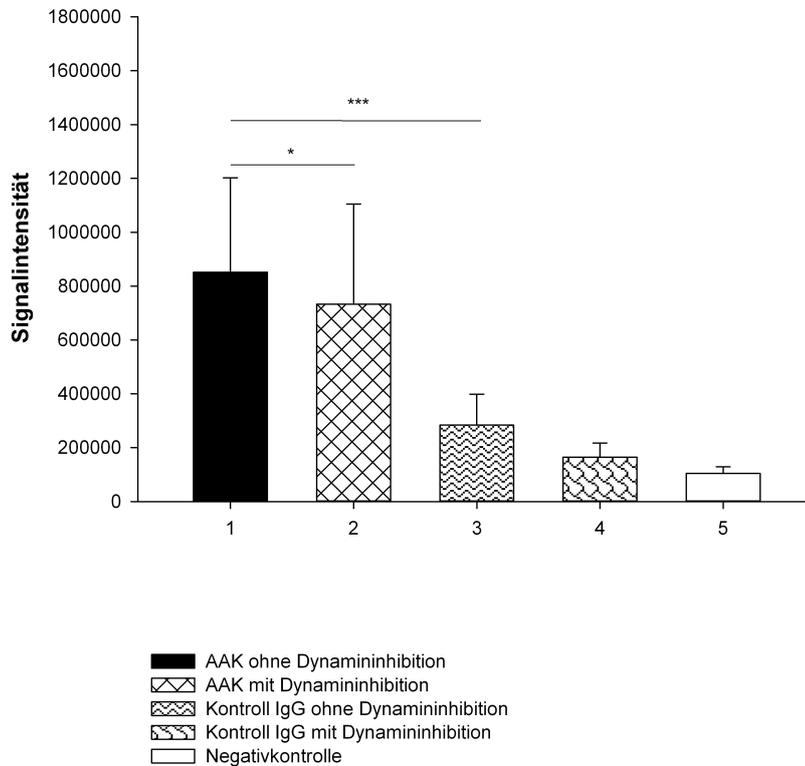


Abb. 16 Antikörperaufnahme mit und ohne Inhibition von Dynamin I und II

Sechs Stunden nach der Inhibition von Dynamin mit dem small-molecule Inhibitor Dyngo[®] 4a (N=131) zeigt sich im Vergleich zu den unbehandelten hippocampalen Neuronen (N=157) eine signifikant reduzierte Aufnahme der h-aAmph-AAK (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Holm-Sidak-Test).

3.2.5 Vermehrte Aufnahme der anti-Amphiphysin Antikörper nach Clathrin-Inhibition mit pitstop[®]2

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Aufnahme von h-aAmph-AAK in hippocampale Neurone (DIV10) von einem clathrin-abhängigen Endozytosemechanismus, wurde der small-molecule Inhibitor pitstop[®]2 verwendet.

Sechs Stunden nach der Inhibition von Clathrin, zeigte sich bei den mit pitstop[®]2 behandelten Zellen ein signifikant ($p < 0,01$) stärkeres Signal der h-aAmph-AAK als bei den ohne small-molecule Inhibitor behandelten Zellen (Abb. 17). Dies ergibt eine signifikant erhöhte Aufnahme der h-aAmph-AAK im Falle der Clathrininhibition mit pitstop[®]2 in primäre hippocampale Neurone sechs Stunden nach der Blockade.

Ig-G Internalisation 6h nach Clathrininhibition

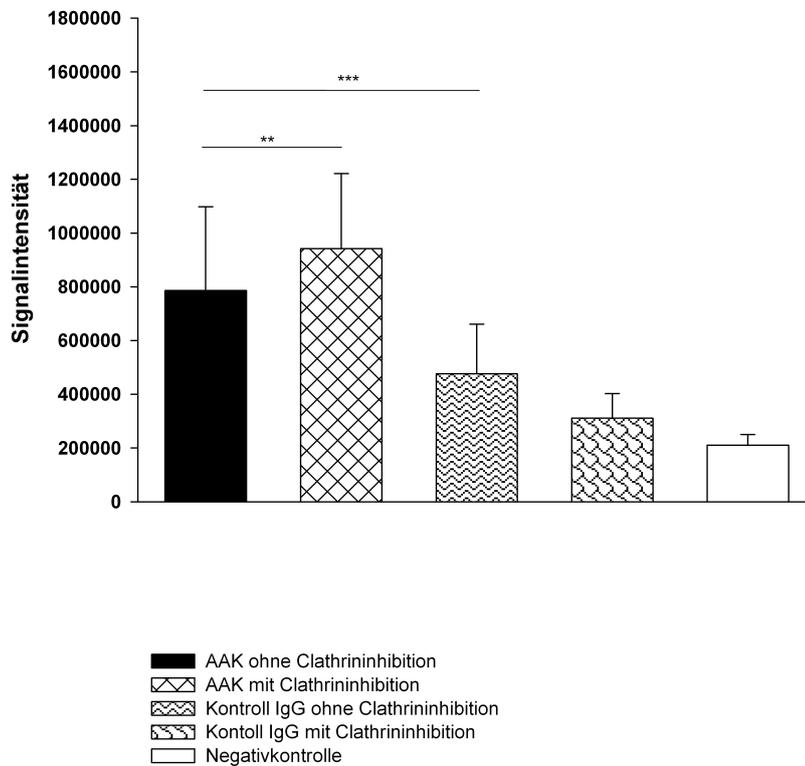


Abb. 17 Antikörperaufnahme mit und ohne Inhibition von Clathrin

Sechs Stunden nach der Inhibition von Clathrin mit dem small-molecule Inhibitor pitstop[®]2 (N=109) zeigt sich im Vergleich zu den unbehandelten hippocampalen Neuronen (N=83) eine signifikant vermehrte Aufnahme der h-aAmph-AK (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Holm-Sidak-Test).

3.3 Etablierung der siRNA-Transfektion

Zur Etablierung der siRNA-Transfektion wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien (s.o.) an vitalen hippocampalen Neuronen angewendet. Die AllStars Hs Cell Death siRNA (Qiagen), die zur Beurteilung der Transfektion zum Einsatz kam, setzt an Genabschnitten an, die zum Überleben der Zellen notwendig waren. Eine erfolgreiche Transfektion sollte sich somit durch einsetzenden Zelluntergang darstellen. Dadurch konnte die morphologische Beurteilung der Zellen unter dem Durchlichtmikroskop zur Überprüfung eines durch die Wirkung der siRNA erzielten Effekts herangezogen werden. Als Negativkontrolle diente die AllStars negative control siRNA (Qiagen).

3.3.1 Etablierung der cell-death siRNA-Transfektion mittels HiPerFect®

Zur Etablierung des Transfektionsreagenz HiPerFect® wurden lebende hippocampale Neurone nach dem in Tab. 1 dargestellten Schema für 72 Stunden inkubiert. Es folgte die morphologische Beurteilung unter dem Durchlichtmikroskop. Dabei zeigte sich bei einer Konzentration der siRNA von 5 nM und einer Menge von 1,5 µl HiPerFect® eine vermehrte Fragmentierung der mit der AllStars Hs Cell Death siRNA behandelten Neurone, im Vergleich mit der Negativkontrolle (s.Abb. 19). Bei einer Konzentration von 1 nM siRNA und 1,5 µl HiPerFect® erschienen die mit der AllStars Hs Cell Death siRNA behandelten Zellen ebenso vital wie diejenigen, die der Negativkontrolle ausgesetzt waren. Die Behandlung mit der AllStars negative control siRNA mit einer HiPerFect®-Menge von 3 µl und 4,5 µl, führte unabhängig der verwendeten siRNA-Konzentration zu einer vermehrten Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze.

Aufgrund der genannten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die siRNA Konzentration von 1 nM aufgrund der weiterhin vitalen Neurone zu keiner ausreichenden Transfektion führte. Oberhalb der Konzentration von 5 nM siRNA zeigen auch die Negativkontrollen eine vermehrte Fragmentierung (s. Abb. 18), was als mögliche zytotoxische Wirkung der siRNA zu deuten ist. In allen Gruppen die mit einer Menge von 3 µl und 4,5 µl HiPerFect® behandelt wurden, scheint ein zytotoxischer Effekt vom Transfektionsreagenz auszugehen. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen wurde ein separater Versuch angeschlossen, der einen möglichen zytotoxischen Effekt von HiPerFect® untersuchte (s.Abb. 20).

Für die Optimierung der siRNA-Transfektion in einer weiteren Versuchsreihe diente auf Grundlage der o.g. Ergebnisse eine siRNA Konzentration von 5 nM und eine Menge von 1,5 µl HiPerFect® als Orientierung für die Variation der Konzentrationen. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Tab. 2 dargestellt.

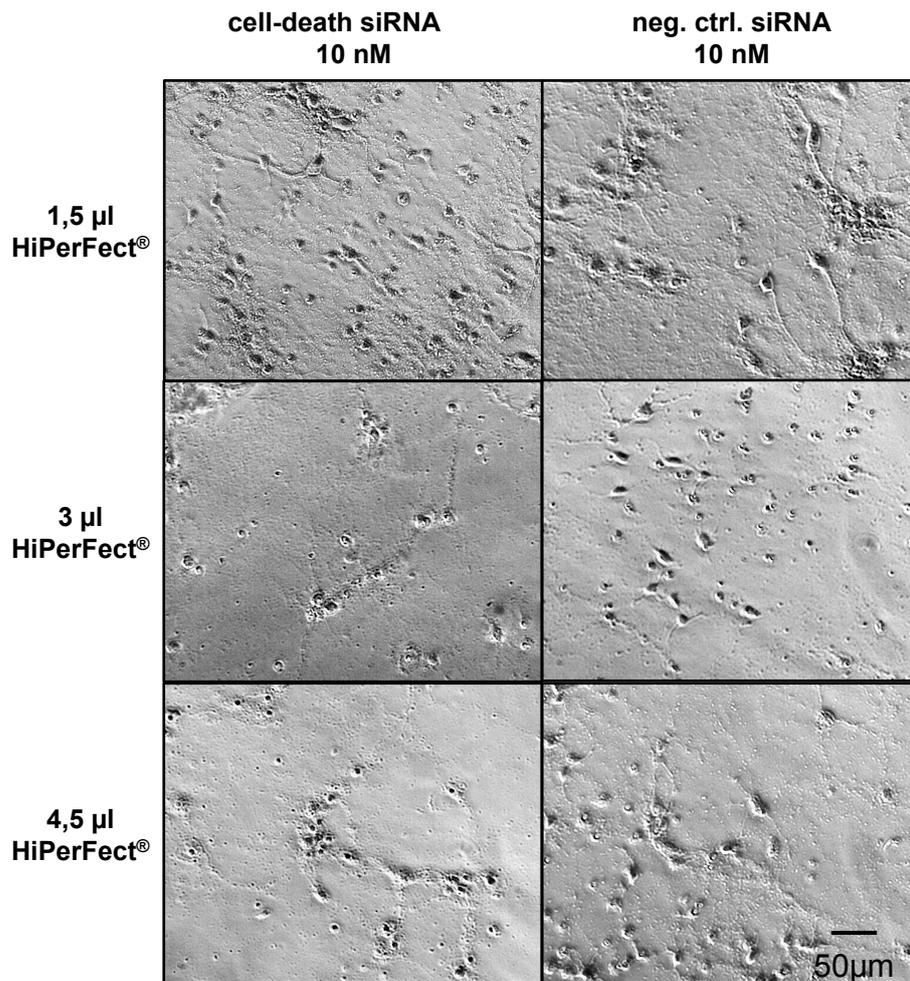


Abb. 18 Etablierung der siRNA-Transfektion mit HiPerFect[®]

In allen Bildern ist eine Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze zu erkennen. Bei den mit der Negativkontroll-siRNA behandelten Zellen fällt diese zwar geringer aus, jedoch erscheinen die Neurone nicht ausreichend unbeeinträchtigt, um für die Untersuchung der Antikörperaufnahme nach Manipulation der Endozytose ausreichend gute Versuchsbedingungen zu erzielen.

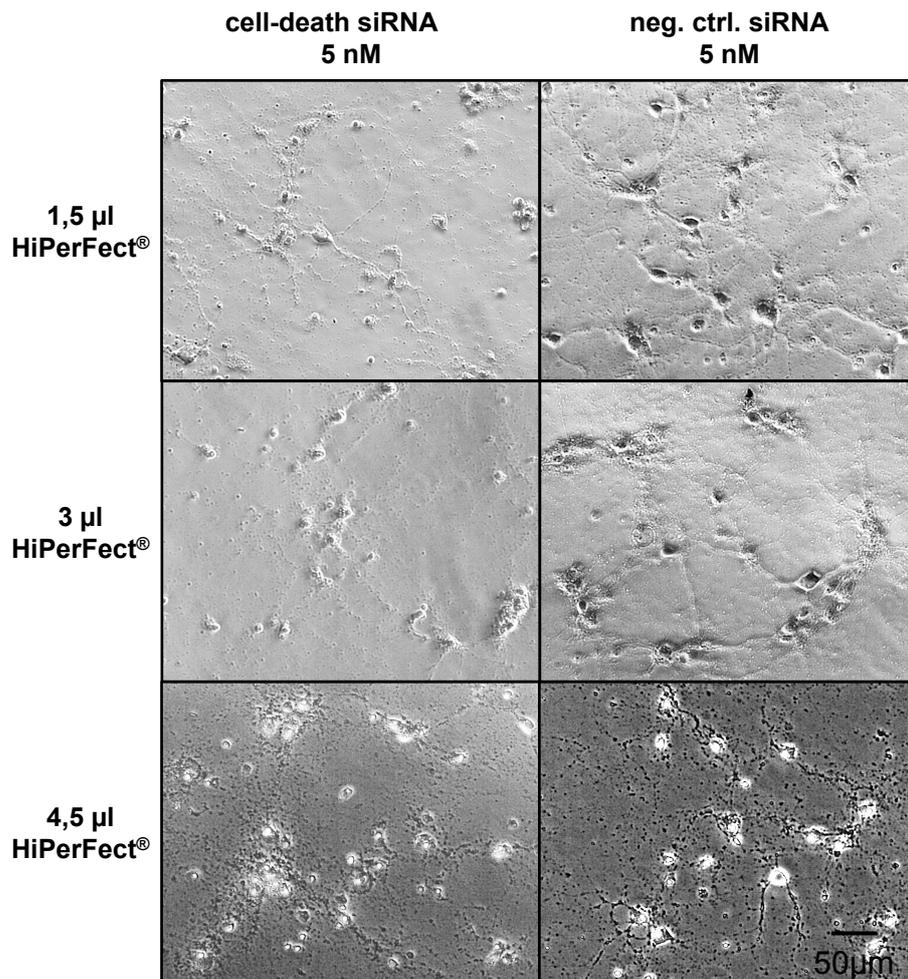


Abb. 19 Etablierung der siRNA Transfektion mit HiPerFect[®]

Bei einer siRNA Konzentration von 5 nM und 1,5 μ l HiPerFect[®] kommt es zu einer deutlichen Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze. Im Vergleich zeigen die mit der Negativkontroll-siRNA behandelten Zellen eine weniger stark beeinträchtigte Morphologie. Bei zunehmender HiPerFect[®] Menge kommt es jedoch auch bei den Negativkontrollen zu verstärkter Fragmentierung der Neurone.

3.3.2 Zytotoxischer Effekt des Transfektionsreagenz HiPerFect[®]

Um einen möglichen zytotoxischen Effekt des Transfektionsreagenz HiPerFect[®] auszuschließen, wurden hippocampale Neurone (DIV10) mit variablen Konzentrationen des Transfektionsreagenz in Neurobasalmedium inkubiert. Dabei zeigte sich bei steigender Konzentration von HiPerFect[®] eine zunehmende Fragmentierung der Axone und Dendriten der Neurone. Dies lässt die Interpretation zu, dass HiPerFect[®] auf hippocampale Neurone einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt ausübt (Abb. 20). In Abb. 21

sind zum Vergleich Positivkontrollen dargestellt, bei denen eine weitgehend erhaltene Zellmorphologie mit dendritisch-axonalem Netzwerk zu sehen ist.

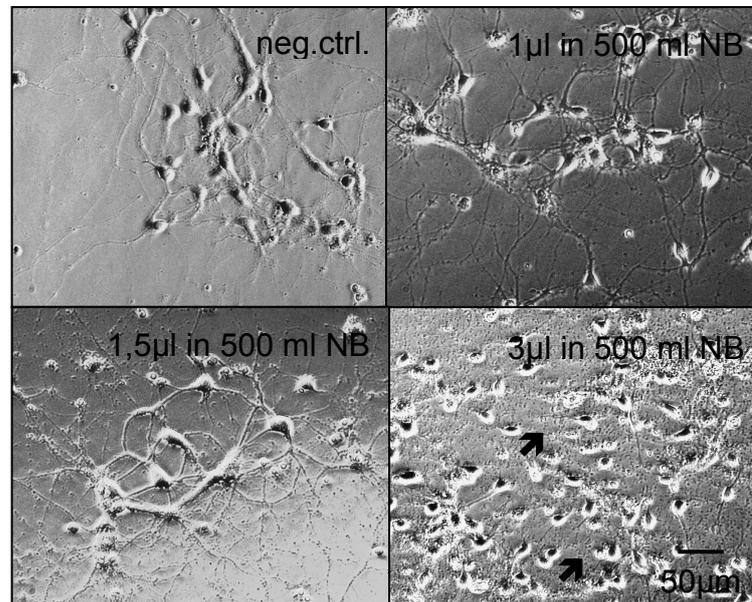


Abb. 20 Zytotoxizitätsassay mit HiPerFect®

Ab 3µl HiPerFect® zeigte sich eine gesteigerte Fragmentierung (↗) der Axone und Dendriten von hippocampalen Neuronen.

Die Erkenntnisse des Zytotoxizitätsassays mit HiPerFect® führten dazu, dass in weiteren Etablierungsversuchen der siRNA-Transfektion nur noch maximal 2 µl des HiPerFect® Transfektionsreagenz verwendet wurden. Dabei zeigten sich unabhängig der siRNA Konzentration (2,5 nM, 5 nM, 7,5 nM) und der verwendeten Menge von HiPerFect® (1 µl, 2µl) keine wesentlichen Unterschiede der zellulären Morphologie zwischen den einzelnen Gruppen (s.Abb. 22, Abb. 23, Abb. 24). Dies deutet auf eine ungenügende Transfektion der siRNA bei der Anwendung von 1 µl und 2 µl HiPerFect® hin. Daraufhin wurden andere Transfektionsreagenzien (N-TER™, GenMute®) zur Etablierung der siRNA-Transfektion herangezogen.

Positivkontrollen

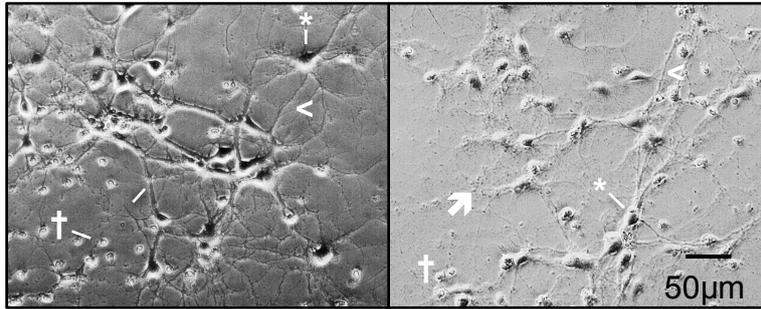


Abb. 21 Morphologie unbehandelter hippocampaler Neurone

Zu sehen sind Somata hippocampaler Neurone (*) mit einem Netzwerk von Dendriten und Axonen (<). Außerdem kommen tote Zellen (†) und Fragmente (↷) abgestorbener Zellfortsätze zur Darstellung.

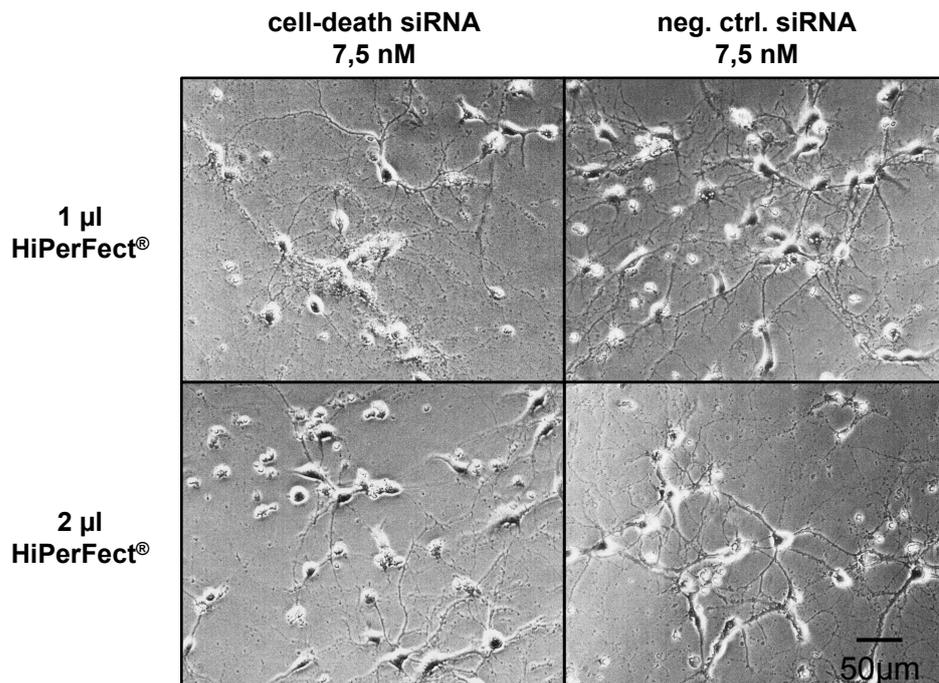


Abb. 22 Morphologie hippocampaler-Neurone nach siRNA Transfektion mit HiPerFect®

Bei der Verwendung der cell-death siRNA (7,5 nM) und der neg. ctrl. siRNA (7,5 nM) zeigen sich bei der Verwendung von 1 µl und 2 µl HiPerFect® keine morphologischen Unterschiede. Daher scheint keine erfolgreiche Transfektion stattgefunden zu haben.

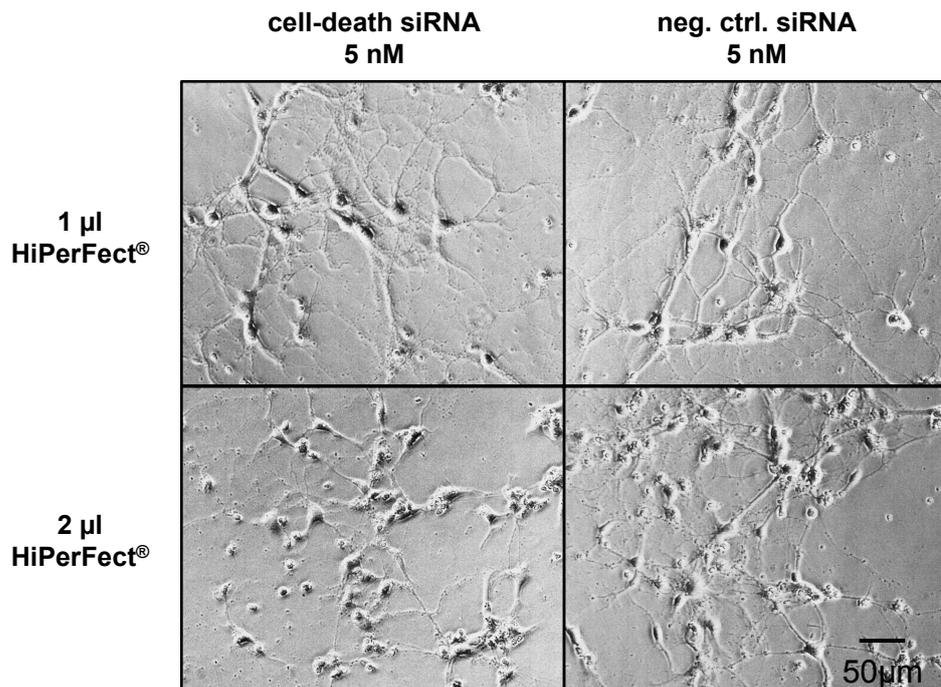


Abb. 23 Morphologie hippocampaler Neurone nach siRNA-Transfektion mit HiPerFect[®]

Bei der Verwendung der cell-death siRNA (5 nM) und der neg. ctrl. siRNA (5 nM) zeigen sich bei der Verwendung von 1 μ l und 2 μ l HiPerFect[®] keine morphologischen Unterschiede, so dass auch hier keine erfolgreiche Transfektion stattgefunden hat.

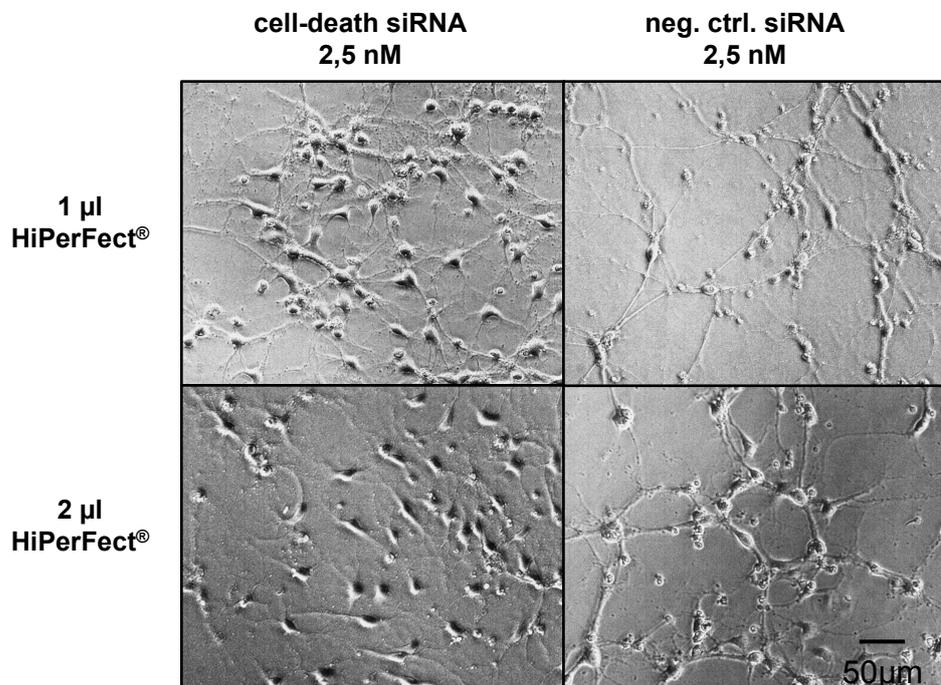


Abb. 24 Morphologie hippocampaler Neurone nach siRNA-Transfektion mit HiPerFect[®]

Bei der Verwendung der cell-death siRNA (2,5 nM) und der neg. ctrl. siRNA (2,5 nM) zeigen sich bei der Verwendung von 1 μ l und 2 μ l HiPerFect[®] keine morphologischen Unterschiede, die auf eine erfolgreiche Transfektion hinweisen.

3.3.3 Etablierung der cell death siRNA-Transfektion mit N-TER™

Nach den erfolglosen Vorversuchen zur Transfektion mittels des HiPerFect® Transfektionsreagenz erfolgte eine weitere Versuchsreihe mit N-TER™. Einer 24 stündigen Inkubation mit dem Transfektionsmedium folgte aufgrund von starkem Zelluntergang eine Reduktion der Inkubationszeit auf sechs und vier Stunden, bei unterschiedlichen siRNA Konzentrationen. Laut Hersteller (SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA) sollen nach dieser Zeit bereits ausreichende knockdown Ergebnisse zu erwarten sein.

Die Behandlung mit der cell-death siRNA zeigte bei den Konzentrationen von 5 nM über sechs Stunden und 2,5 nM über vier Stunden eine Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze. Bei 1,75nM über vier Stunden waren keine morphologischen Auswirkungen zu detektieren. Bei einer Konzentration von 5 nM kam es auch bei der control siRNA zur Fragmentierung der Neurone. Bei 2,5 nM und 1,75 nM über jeweils vier Stunden war keine Fragmentierung zu erkennen (Abb. 25). Eine mögliche zytotoxische Wirkung des Puffers zeigte sich bei keiner der durchgeführten Mockkontrollen.

Aus den mit der cell-death siRNA ermittelten Ergebnissen war abzuleiten, dass eine effiziente Transfektion der siRNA durch die Inkubation der hippocampalen Neurone über vier Stunden mit einer siRNA-Konzentration von 2,5 nM unter Verwendung des N-TER™ Transfektionsreagenz zu erreichen sein sollte. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem GenMute® Transfektionsreagenz herzustellen, für das eine siRNA Konzentration von 5nM empfohlen war, wurde ein weiterer Etablierungsschritt mit 5nM siRNA bei einer Inkubationszeit von vier anstatt sechs Stunden durchgeführt. Hier zeigte sich bei der cell-death siRNA eine Fragmentierung der Neurone und ihrer Fortsätze. Bei der negative control siRNA und den unbehandelten Zellen fand sich keine relevante Fragmentierung (Abb. 26). Daher wurden die Folgeversuche zum knockdown der MAP-K-1 mit einer siRNA Konzentration von 5 nM durchgeführt.

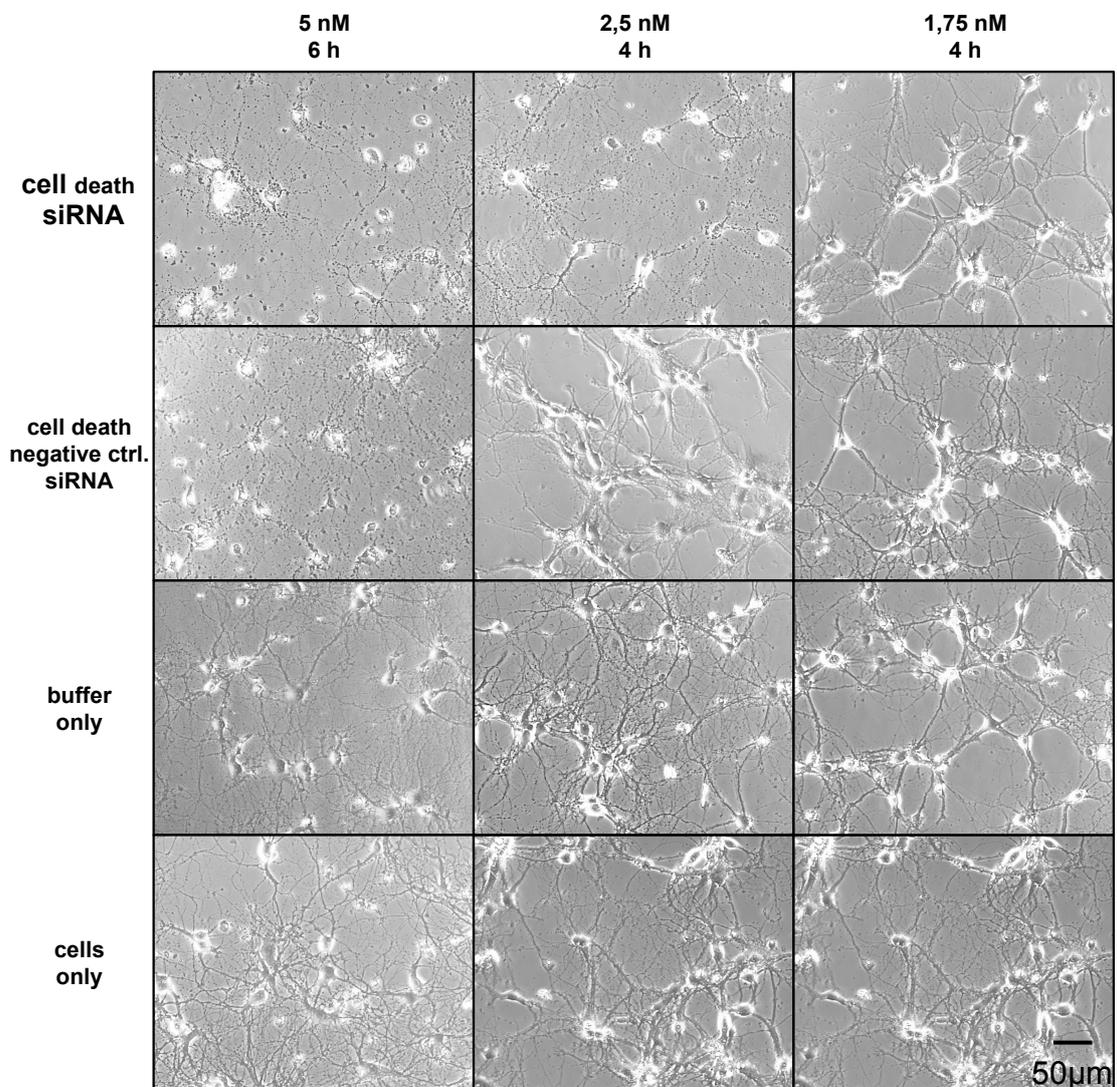


Abb. 25 Etablierungsversuch der siRNA-Transfektion mit N-TER™

Der gewünschte Zelluntergang als Hinweis auf eine erfolgreiche Transfektion zeigte sich bei der Verwendung von 2,5 nM cell-death siRNA (mittlere Spalte). Bei gleicher Konzentration der Kontroll-siRNA trat keine Fragmentierung auf. Bei niedrigerer Konzentration der cell-death siRNA ist kein Zelluntergang zu beobachten. Die alleinige Behandlung der Neurone mit dem N-TER™ Puffer scheint keinerlei zytotoxische Effekte aufzuweisen.

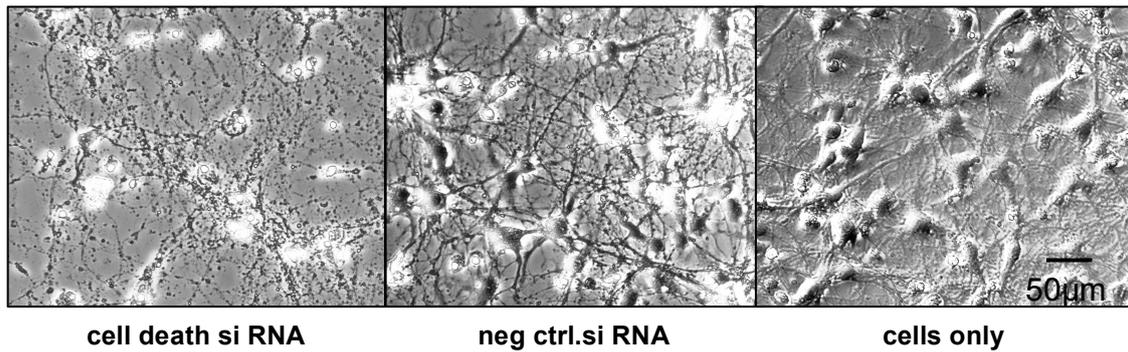


Abb. 26 Etablierungsversuch der siRNA-Transfektion mit N-TER™

Bei der Verwendung von 5 nM cell-death siRNA und einer Inkubationszeit von 4h (Links) zeigt sich die gewünschte Zellfragmentierung als Hinweis auf eine erfolgreiche Transfektion mit N-TER™. Bei der Verwendung der neg. ctrl. siRNA (Mitte) und bei den unbehandelten Zellen (Rechts) zeigen sich nach vierstündiger Inkubation intakte Neurone und deren Fortsätze.

3.3.4 Hinweise auf reduzierte Genexpression der MAP-Kinase 1 durch siRNA Knockdown mit dem Transfektionsreagenz GenMute®

Mit der cell-death siRNA wurden die zur Transfektion nötigen Konzentrationen der Reagenzien durch morphologische Beurteilung erarbeitet. Mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen erfolgten die nächsten Schritte in der Etablierung. Zur Erfolgskontrolle der Transfektion auf der Ebene der Nukleinsäuren wurde im Anschluss an die Behandlung der hippocampalen Neurone mit der MAP-K-1 siRNA die RNA aufgereinigt. Eine reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA folgte, bevor eine qPCR zur Quantifizierung der cDNA und damit die Erfolgskontrolle des Knockdowns auf Genebene durchgeführt wurde. Aufgrund der ubiquitären Expression und der kommerziellen Verfügbarkeit von etablierten siRNAs wurde die MAP-K 1 als Zielgen ausgewählt.

Aus den hippocampalen Neuronen ließen sich nur begrenzte RNA-Mengen extrahieren, weshalb für die Durchführung der qPCR eine geringe Probenanzahl zur Verfügung stand. Aufgrund der geringen Probenanzahl ist eine Aussage bezüglich einer statistischen Signifikanz nicht möglich. In Betrachtung der Daten in Abb. 27 erscheint bei den mit dem GenMute® Transfektionsreagenz behandelten hippocampalen Neuronen eine Tendenz zu einer Gensuppression infolge des Knockdowns zu erkennen. Wohingegen

keine ausreichend reduzierte Genexpression der MAP-K-1 infolge der siRNA-Transfektion mit dem Transfektionsreagenz N-TER™ zu bestehen scheint.

siRNA Knockdown der Mapkinase 1

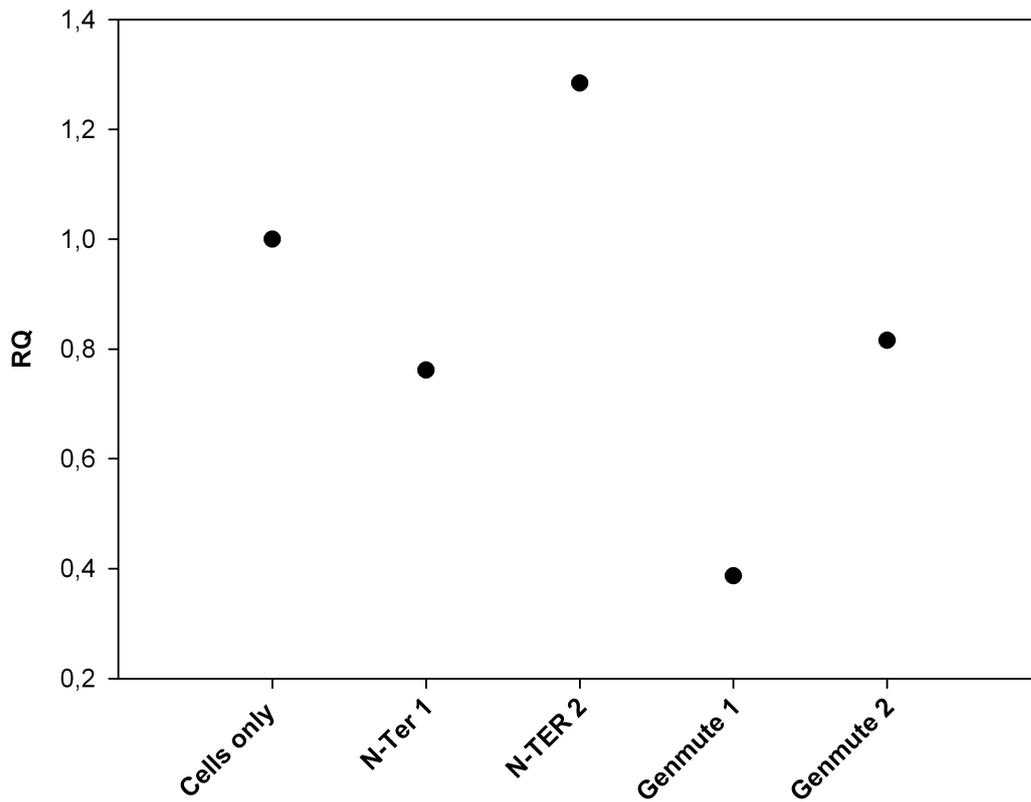


Abb. 27 siRNA Knockdown der MAP-K-1

Darstellung der relativen Quantifizierung (RQ) der in der qPCR ermittelten Einzelwerte nach Behandlung der hippocampalen Neurone mit der MAP-K-1 siRNA und den Transfektionsreagenzien N-TER™, oder GenMute®, normalisiert zum Mittelwert der unbehandelten Zellen (Cells only).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zelluläre Aufnahmemechanismen von SPS assoziierten AAK gegen Amphiphysin am Modell primärer hippocampaler Neurone zu identifizieren. Der direkte pathogene Effekt dieser Antikörper wird weiterhin kontrovers diskutiert, da das Zielantigen Amphiphysin primär intrazellulär lokalisiert ist. Belege für eine pathogene Rolle der AAK gibt es durch frühere Studien, in denen mittels passiv-Transfer Experimenten eine selektive Vulnerabilität der GABAergen Neurotransmission gezeigt werden konnte, die durch die Interaktion der Antikörper und Amphiphysin bedingt ist. In diesen Experimenten führte der intrathekale passive Transfer der AAK bei Mäusen zum Auftreten krankheitstypischer Symptome und einer reduzierten GABAergen Inhibition (Geis et al., 2010). Es konnten experimentelle Belege erbracht werden, dass diese pathogenen AAK von Zellen internalisiert werden, um ihr intrazelluläres Antigen binden zu können (Geis et al., 2010).

Um mögliche Aufnahmemechanismen zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit am Zellkulturmodell die Blockade der Endozytose mittels small-molecule Inhibitoren herbeigeführt. Ziele der spezifischen Inhibitoren waren Clathrin und Dynamin, wichtige Schlüsselproteine der Endozytose. Die anschließende Analyse der Antikörperaufnahme erfolgte mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen.

In einem zweiten Versuchsteil wurde versucht an hippocampalen Neuronen eine siRNA-Transfektion zu etablieren, welche eine reduzierte Synthese der an der Endozytose beteiligten Proteine und dadurch eine Störung der jeweiligen Endozytosemaschinerie herbeiführen sollte.

4.1 Diskussion der small-molecule Inhibitor- und FM-dye Versuche

4.1.1 Alternative Endozytosewege infolge der Inhibition von Clathrin oder Dynamin

Die Ergebnisse der Experimente mit dem Membranfarbstoff FM-dye deuten darauf hin, dass zu frühen Zeitpunkten eine reduzierte Aktivität der Endozytosevorgänge durch die small molecule Inhibitoren erzielt wurde. Der Membranfarbstoff FM-dye wird im Rahmen der Vesikelendozytose an die Vesikelmembran gebunden und internalisiert (Verstreken et al., 2008). Zwei Stunden nach der Inhibition von Clathrin mit pitstop[®]2 zeigte sich eine um 22,1% reduzierte Signalintensität der FM-dye Aufnahme in hippocampale Neurone. Im Falle der Blockade von Dynamin durch Dyngo[®] 4a ergab sich eine Reduktion um 25,5%. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass mittels der Blockade durch pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a nur ein Teil der Endozytosemaschinerie beeinflusst wurde.

Sechs Stunden nach der Inhibition mit pitstop[®]2 wurde entgegen der aufgestellten Hypothese eine um 39,2% gesteigerte Signalintensität der FM-Dyes im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ermittelt. Die Blockade durch Dyngo[®] 4a führte sechs Stunden nach der Inhibition zu einer leichten Reduktion der FM-dye Signalintensität von 7,4%, somit nur zu einem geringen Effekt.

Daraus resultierte die Hypothese, dass die inhibitorische Wirkung der small molecule inhibitoren mehr als zwei Stunden nach der Blockade nachlässt. Ein weiterer Erklärungsversuch für die gesteigerte FM-dye Aufnahme ist eine kompensatorische Aktivierung alternativer Endozytosewege infolge der Blockade von Clathrin oder Dynamin. Die durch diesen hypothetischen Mechanismus gesteigerte endozytotische Aktivität, könnte für die deutlich vermehrte Aufnahme der FM-dyes, sechs Stunden nach der Blockade mit pitstop[®]2, verantwortlich sein. Ein Hinweis darauf, dass die stark erhöhte Aufnahme des FM-dye trotz der Inhibition mit pitstop[®]2 keine zufällige Beobachtung ist, sieht man bei dem Vergleich mit dem Internalisierungsversuch der AAK. Dort konnte ebenfalls nach sechsstündiger Inkubation, parallel zum

FM-dye Versuch, eine vermehrte Aufnahme der AAK detektiert werden (Abb. 17).

Mögliche Mechanismen die für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten, sind die ultraschnelle Endozytose (ultrafast endocytosis, UFE) und die aktivitäts-abhängige bulk Endozytose (ADBE). Zwei Vorgänge, die als alternative Wege neben der CME zum Vesikel-Recycling an Nervenendigungen des ZNS beitragen (Watanabe et al., 2013, Cousin, 2009).

In beiden Fällen erfolgt die Abschnürung von deutlich größeren Endosomen direkt von der präsynaptischen Membran im Vergleich zum Recycling synaptischer Vesikel mittels der CME. Über diesen alternativen Endozytoseweg könnte eine unspezifische Internalisierung von FM-dyes aber auch der AAK erfolgen.

4.1.2 Die Rolle von Dynamin und Clathrin bei der Internalisierung der AAK

Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden zeigte sich bei den mit Dyngo[®]4a behandelten Neuronen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur eine geringe Reduktion der Aufnahme der AAK. Ob es in Analogie zu den FM-dye Versuchen auch zu einer deutlicheren Reduktion der AAK Aufnahme nach zwei Stunden in Erscheinung kommt, ist eine interessante Fragestellung für zukünftige Experimente. Allerdings ist festzuhalten, dass bei den FM-dye Versuchen im Gegensatz zu den Versuchen zur Aufnahme von AAK die Endozytose durch Applikation von hochmolarem Kalium massiv stimuliert wurde. In den Inkubationsversuchen dieser Arbeit zeigte sich auch, dass ein Unterschied der spezifischen neuronalen Antikörper-Anlagerung im Vergleich zum Kontrollantikörper erst nach sechsständiger Inkubation mit den AAK zu detektieren war. Um dieses Problem zu umgehen, könnte analog zu dem Versuch mit FM-dyes eine Stimulation zur Aktivitätssteigerung der Endozytose z.B. mittels hochmolarem Kalium erwogen werden und damit eine Beschleunigung der Antikörperaufnahme bereits nach zwei Stunden erreicht werden. Die daraus gewonnen Ergebnisse müssten allerdings ebenso mit Vorsicht interpretiert werden, da eine Stimulation der Neurone auch zu einer

Steigerung der Aktivität alternativer Endozytosemechanismen wie der UFE und der ADBE führen könnte.

4.1.3 Interpretation der unterschiedlich gesteigerten Endozytose nach Dynamin- und Clathrin-Inhibition zu späten Zeitpunkten

Im Gegensatz zu der deutlich gesteigerten Endozytose von FM-dyes und AAK nach sechs Stunden nach Vorbehandlung mit pitstop[®]2 zeigte sich ein beinahe nicht mehr vorhandener Unterschied des FM-dye Signals und ein leichter Rückgang bei den mit Dyngo[®] 4a behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen. Hieraus resultiert die interessante Frage, warum es nach der Blockade von Clathrin, aber nicht von Dynamin, zu einer deutlich gesteigerten späten Aufnahme der AAK und der FM-dyes kommt. Zur Klärung dieser Frage ist eine genaue Betrachtung der Beteiligung beider Proteine an den alternativen Wegen notwendig. Auf der einen Seite wird die Unabhängigkeit der UFE und der ADBE von Clathrin bei Säugern und Wirbellosen beschrieben (Kononenko et al., 2014, Watanabe et al., 2014, Kasprovicz et al., 2008). Andererseits ist Dynamin I an der Abschnürung von bulk Endosomen (Clayton et al., 2009) und gemeinsam mit Actin für die UFE bei hippocampalen Synapsen von Mäusen essentiell (Watanabe et al., 2013). Der Dynamininhibitor Dyngo[®] 4a sorgte ebenfalls zu einer reduzierten ADBE in kultivierten Neuronen und Synaptosomen (Mccluskey et al., 2013).

Nach den o.g. Erkenntnissen sollten die alternativen Endozytosemechanismen trotz der Inhibition von Clathrin ungestört ablaufen können, da diese von dem Protein unabhängig zu sein scheinen. Durch die Blockade von Dynamin würden jedoch beide beschriebenen Alternativen in ihrer Effektivität eingeschränkt werden. Dies könnte eine plausible Erklärung für die erhöhte AAK- und FM-dye Aufnahme bei den mit pitstop[®]2 behandelten Neuronen sein.

Um in zukünftigen Experimenten mehrere Endozytosewege gleichzeitig zu blockieren und die Auswirkung möglicher auftretender alternativer Wege zu reduzieren, sollte die simultane Inhibition von Dynamin und Clathrin verfolgt werden. Einen gegebenenfalls begrenzenden Faktor in solch einem

Versuchsaufbau könnten allerdings auch zytotoxische Effekte durch das Zusammenwirken der beiden small-molecule Inhibitoren darstellen. Dass es derartige Effekte gibt, konnte in dieser Arbeit am Beispiel des Dynaminhinhibitors MiTMAB[®] belegt werden.

4.1.4 Keine spezifische Blockade der CME durch pitstop[®]2 und Dyngo[®]4a

Der small-molecule Inhibitor pitstop[®]2 diene der Inhibition von Clathrin. Laut Literaturangaben sollte pitstop[®]2 eine spezifische Inhibition der CME bewirken (Von Kleist et al., 2011). Neuen Erkenntnissen zu Folge soll die Verwendung von pitstop[®]2 jedoch keine Differenzierung zulassen, ob bei der Aufnahme der AAK eine CME oder CIE vorliegt. Da die Internalisierung zahlreicher clathrin-unabhängig aufgenommener Moleküle mit pitstop[®]2 blockiert wurde, scheint pitstop[®]2 sowohl die CME als auch die CIE zu beeinflussen (Dutta et al., 2012). Demzufolge können die Ergebnisse dieser Arbeit keine sichere Antwort auf die Frage geben, ob die reduzierte Aufnahme der FM-dyes zwei Stunden nach der Inhibition mit pitstop[®]2 auf eine Blockade clathrin-abhängiger, oder unabhängiger Endozytosemechanismen zurückzuführen ist, oder beide Wege eine gleichberechtigte Rolle spielen. Auch die Blockade von Dynamin lässt dabei keine sichere Unterscheidung zu. Seit der Erkenntnis, dass Dynamin neben der Beteiligung an der CME ebenfalls eine Rolle bei manchen Wegen der CIE spielt (Lamaze et al., 2001), sind seine Inhibitoren nicht zur Differenzierung zwischen der CME und CIE geeignet. Außerdem wurde die Spezifität der Inhibitoren, Dyngo[®] 4a und dynasore[®] in der Vergangenheit in Frage gestellt (Park et al., 2013). Die Interpretation der Ergebnisse ist daher kritisch zu betrachten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Endozytosemechanismus nicht ausreichend durch die Blockade eines einzigen Moleküls unterbrochen werden kann um den genauen Internalisierungsweg von AAK gegen intrazelluläre Antigene zu ergründen. Hinter dem Vorgang der Endozytose steckt eine hoch komplexe Maschinerie, die es ermöglicht auf externe Blockade mit unterschiedlichen Kompensationsmöglichkeiten und alternativen Signalwegen

zu reagieren. Für die Zukunft ist eine gleichzeitige Blockade mehrerer Schlüsselproteine zu hinterfragen, um auch das Auftreten kompensatorischer Mechanismen einzudämmen. Dabei muss jedoch wiederum ein starkes Augenmerk auf die Zellvitalität der empfindlichen Neurone gelegt werden. Sollte dies gelingen, könnte wahrscheinlich eine genauere Aussage über den Aufnahmemechanismus und dessen Zeitverlauf getroffen werden.

4.1.5 Etablierung des siRNA knockdown

Die Etablierung des siRNA knockdowns an hippocampalen Neuronen von E18 Mäusen gestaltete sich komplex und schwieriger als erwartet. Die hippocampalen Neurone als primäre neuronale Zellkultur sind bekannt als schwer zu transfizierende Zellen (Rungta et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit stellten sich einige schwierige Faktoren heraus, die in einer starken Vulnerabilität der primären Neurone resultieren.

Zahlreiche Zwischenschritte waren in der Etablierung notwendig. Zuerst ergab sich die Frage nach einem geeigneten Transfektionsreagenz um die siRNA durch die Zellmembran ins Zellinnere zu schleusen. Im Rahmen der Versuche fiel auf, dass die Zellvitalität der hippocampalen Neurone teilweise bereits durch die Wahl des Reagenz sowie durch dessen Konzentration stark beeinflusst wurde. Seitens der Transfektionsreagenzien fanden sich letztlich GenMute[®] und N-TER[™] als Kandidaten zur weiteren Etablierung.

Des Weiteren schien auch von der siRNA selbst unabhängig von deren Zielgenen eine Zytotoxizität auszugehen. In Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen kam es auch unter Verwendung der Negativkontrolle zu erheblichem Zelltod. Es waren daher zahlreiche Konzentrationsreihen nötig um die optimalen Knockdown-Bedingungen in Kombination des Transfektionsreagenz zusammen mit der siRNA zu ermitteln.

Die zum erfolgreichen Knockdown benötigte siRNA Konzentration wurde mit der cell death siRNA ermittelt, die an DNA Sequenzen ansetzt, die für die

Lebensfähigkeit der Zellen essentiell sind. Somit konnte auch hier die Beurteilung einer erfolgreichen Transfektion mittels dem Durchlichtmikroskop und der Beurteilung der Vitalität der Neurone und deren Fortsätze erfolgen. Nachdem anhand dessen die optimale Konzentration von 5 nM erarbeitet wurde, wurde als exemplarisches Zielgen zur weiteren Etablierung die MAP-K-1 verwendet.

Um auf Genebene den Knockdownerfolg sicherzustellen, bevor Versuche mit den AAK erfolgen sollten, war eine quantitative real time PCR notwendig. In diesem Zusammenhang fand sich mit der Menge an extrahierter RNA ein weiterer limitierender Faktor. Um eine ausreichende RNA Menge für die qPCR zu gewinnen, mussten 4 Wells á 50000 hippocampaler Neurone zusammengeführt werden, bevor die weitere Aufreinigungsprozedur durchgeführt wurde.

In der qPCR konnte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden RNA-Mengen nur eine kleine Probenanzahl untersucht werden. Bei der Bildung der Mittelwerte scheint sich ein gewisser Knockdownerfolg in der Verwendung des GenMute[®] Transfektionsreagenz zu zeigen. Unter N-TER[™] fand sich kein Hinweis auf eine ausreichende Gensuppression.

Die nötige Qualität der durchgeführten qPCR scheint bei stabilen Ergebnissen der 5 unterschiedlichen mitgeführten endogenen Kontrollen gegeben zu sein. Um eine bessere Beurteilung zu erlauben müssen in Zukunft größere RNA-Mengen extrahiert werden um eine umfangreichere Probenzahl zu ermöglichen.

Anhand der Beschreibung des Etablierungsversuches ist ersichtlich, dass zahlreiche Zwischenschritte nötig sind, um am Ende eine Gensuppression herbeizuführen. Zahlreiche Faktoren und potentielle Fehlerquellen sind also für einen erfolgreichen knockdown zu beachten. Zu den bereits genannten kommt hinzu, dass sich die Transfektionsreagenzien in ihren Wirkmechanismen unterscheiden, was ebenfalls zu unterschiedlichen Transfektionseffizienzen führen könnte. Abgesehen davon ist natürlich die Qualität der Zellkulturen eine

wichtige Grundvoraussetzung. Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich die grundlegenden Etablierungsschritte für eine erfolgreiche Transfektion und Verwendung von siRNA an primären Neuronen erfolgen.

Das Ziel weiterführender Arbeiten sollte nun sein, siRNAs gegen Clathrin und Dynamin zu testen, um im Anschluss die Rolle dieser Proteine bei der Aufnahme der h-aAmph-AAK zu untersuchen. Ein erfolgreicher Knockdown der entsprechenden Proteine würde eine Evaluation auch über einen längeren Zeitraum erlauben, als es für den offensichtlich nur vorübergehenden Effekt (zwei Stunden) der Clathrin und Dynamin small-molecule Inhibitoren möglich war. Auch könnte hier über Kombination von siRNA und Inhibitor evtl. eine kombinierte Suppression verschiedener Signalwege erreicht werden.

5 Zusammenfassung

Das Stiff-Person-Syndrom ist eine autoimmun bedingte Erkrankung des zentralen Nervensystems. Man kann die klassische und die paraneoplastische Form sowie diverse Varianten unterscheiden. Dabei kommen mehrere Antikörper mit unterschiedlichen Zielstrukturen in Betracht. In 80% der Fälle werden Autoantikörper (AAK) gegen GAD-65, ein Enzym, das für die Synthese des Neurotransmitters GABA verantwortlich ist, nachgewiesen. Die typische Symptomatik besteht aus Muskelsteifheit und Muskelkrämpfen v.a. der Rumpf- und proximalen Extremitätenmuskulatur. Bei paraneoplastischer Genese der Erkrankung entstehen häufig AAK gegen Amphiphysin, ein intrazellulär gelegenes Protein, welches eine Schlüsselrolle im Rahmen der Vesikel-Endozytose einnimmt. In Folge des gestörten Vesikel-Recyclings kommt es durch eine Reduktion der GABAergen Inhibition zur krankheitstypischen Symptomatik. In dieser Arbeit wurden mögliche Mechanismen der Internalisierung von anti-Amphiphysin Antikörpern in primäre hippocampale Neurone von E18 Mäusen untersucht. Hierzu wurde die Verwendung der small-molecule Inhibitoren pitstop[®]2 und Dyngo[®] 4a etabliert, um Clathrin- bzw. Dynamin-abhängige Endozytosewege in den primären Neuronen zu unterbinden. Dabei zeigten sich Hinweise auf eine Beteiligung der Clathrin- und Dynamin-abhängigen Endozytose an der Aufnahme der AAK. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach einer frühen Suppression der Endozytose infolge der Inhibition zu einer Aktivitätssteigerung alternativer und kompensatorischer Endozytosewege kommt. Die Etablierung einer siRNA Transfektion an hippocampalen Neuronen blieb trotz der Verwendung diverser Transfektionsreagenzien schwierig. Es konnten durch mehrere Versuchsreihen potentiell geeignete Konzentrationen von Transfektionsreagenz und siRNA ermittelt werden. Unter dieser Kombination deutet sich in exemplarischen Pilotexperimenten eine Gensuppression der MAP-Kinase 1 mit dem Transfektionsreagenz GenMute[®] an.

6 Literaturverzeichnis

Abrami, L., et al. 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol*, 160, 321-8.

Agrawal, N., et al. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 657-85.

Alarcon-Segovia, D., et al. 1979. Antibody penetration into living cells. II. Anti-ribonucleoprotein IgG penetrates into Tgamma lymphocytes causing their deletion and the abrogation of suppressor function. *J Immunol*, 122, 1855-62.

Alexopoulos, H. & Dalakas, M. C. 2010. A critical update on the immunopathogenesis of Stiff Person Syndrome. *Eur J Clin Invest*, 40, 1018-25.

Amato, A. A., et al. 1994. Treatment of stiff-man syndrome with intravenous immunoglobulin. *Neurology*, 44, 1652-4.

Ameli, R., et al. 2005. A neuropsychological assessment of phobias in patients with stiff person syndrome. *Neurology*, 64, 1961-3.

Anderson, R. G., et al. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, 10, 351-64.

Bashkirov, P. V., et al. 2008. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell*, 135, 1276-86.

Bernstein, E., et al. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.

Blanchard, E., et al. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 80, 6964-72.

Boucrot, E., et al. 2010. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One*, 5, e10597.

Butler, M. H., et al. 2000. Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. *Neuron*, 26, 307-12.

Chen, Y., et al. 2003. Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell*, 115, 37-48.

Clayton, E. L., et al. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurosci*, 29, 7706-17.

Collins, B. M., et al. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109, 523-35.

Cousin, M. A. 2009. Activity-dependent bulk synaptic vesicle endocytosis--a fast, high capacity membrane retrieval mechanism. *Mol Neurobiol*, 39, 185-9.

- Dalakas, M. C. 2009. Stiff person syndrome: advances in pathogenesis and therapeutic interventions. *Curr Treat Options Neurol*, 11, 102-10.
- Dalby, B., et al. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 33, 95-103.
- David, C., et al. 1996. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 331-5.
- David, C., et al. 1994. Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett*, 351, 73-9.
- Davidson, T. J., et al. 2004. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci*, 24, 10040-6.
- De Camilli, P. & Takei, K. 1996. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron*, 16, 481-6.
- De Camilli, P., et al. 1993. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med*, 178, 2219-23.
- Deinhardt, K., et al. 2006. Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol*, 174, 459-71.
- Di Paolo, G., et al. 2002. Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron*, 33, 789-804.
- Dinkel, K., et al. 2002. Stiff-man syndrome: identification of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 as a novel 80-kDa antineuronal antigen. *J Neuroimmunol*, 130, 184-93.
- Dutta, D., et al. 2012. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLoS One*, 7, e45799.
- Elbashir, S. M., et al. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200.
- Espay, A. J. & Chen, R. 2006. Rigidity and spasms from autoimmune encephalomyelopathies: stiff-person syndrome. *Muscle Nerve*, 34, 677-90.
- Fedorov, Y., et al. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 12, 1188-96.

- Ferguson, S. M., et al. 2009. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, 17, 811-22.
- Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- Folli, F., et al. 1993. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N Engl J Med*, 328, 546-51.
- Gad, H., et al. 2000. Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron*, 27, 301-12.
- Geis, C., et al. 2011. Human stiff-person syndrome IgG induces anxious behavior in rats. *PLoS One*, 6, e16775.
- Geis, C., et al. 2010. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain*, 133, 3166-80.
- Golan, T. D., et al. 1993. Penetration of autoantibodies into living epithelial cells. *J Invest Dermatol*, 100, 316-22.
- Grant, B. D. & Donaldson, J. G. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 597-608.
- Hadavi, S., et al. 2011. Stiff person syndrome. *Pract Neurol*, 11, 272-82.
- Hammond, S. M., et al. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-6.
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 244-51.
- Harper, C. B., et al. 2011. Dynamin inhibition blocks botulinum neurotoxin type A endocytosis in neurons and delays botulism. *J Biol Chem*, 286, 35966-76.
- Henne, W. M., et al. 2010. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328, 1281-4.
- Henningsen, P., et al. 1996. Psychological factors in the diagnosis and pathogenesis of stiff-man syndrome. *Neurology*, 47, 38-42.
- Heuser, J. E. & Reese, T. S. 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*, 57, 315-44.
- Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374, 190-2.

- Hopkins, C. R., et al. 1985. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J Cell Sci Suppl*, 3, 173-86.
- Kaksonen, M., et al. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123, 305-20.
- Karra, D. & Dahm, R. 2010. Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci*, 30, 6171-7.
- Kasprowicz, J., et al. 2008. Inactivation of clathrin heavy chain inhibits synaptic recycling but allows bulk membrane uptake. *J Cell Biol*, 182, 1007-16.
- Kelly, B. T., et al. 2008. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, 456, 976-79.
- Kissel, J. T. & Elble, R. J. 1998. Stiff-person syndrome: stiff opposition to a simple explanation. *Neurology*, 51, 11-4.
- Kononenko, N. L., et al. 2014. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*, 82, 981-8.
- Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. 2002. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11926-9.
- Lam, J. K., et al. 2015. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4, e252.
- Lamaze, C., et al. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*, 7, 661-71.
- Lee, J. K., et al. 2005. Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex. *Exp Neurol*, 196, 430-40.
- Levy, L. M., et al. 1999. The stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid. *Ann Intern Med*, 131, 522-30.
- Lorish, T. R., et al. 1989. Stiff-man syndrome updated. *Mayo Clin Proc*, 64, 629-36.
- Lv, H., et al. 2006. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 114, 100-9.
- Macia, E., et al. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, 10, 839-50.

- Macrae, I. J., et al. 2008. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 512-7.
- Marsh, M. & McMahon, H. T. 1999. The structural era of endocytosis. *Science*, 285, 215-20.
- Mccluskey, A., et al. 2013. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic*, 14, 1272-89.
- McMahon, H. T. & Boucrot, E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 517-33.
- McMahon, H. T., et al. 1997. Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett*, 413, 319-22.
- Mcmanus, M. T. & Sharp, P. A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 3, 737-47.
- Meinck, H. M. & Thompson, P. D. 2002. Stiff man syndrome and related conditions. *Mov Disord*, 17, 853-66.
- Meister, G. & Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-9.
- Micheva, K. D., et al. 1997. SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett*, 414, 308-12.
- Moersch, F. P. & Woltman, H. W. 1956. Progressive fluctuating muscular rigidity and spasm ("stiff-man" syndrome); report of a case and some observations in 13 other cases. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 31, 421-7.
- Morris, R. E., et al. 1985. Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect Immun*, 50, 721-7.
- Mousavi, S. A., et al. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, 377, 1-16.
- Mundigl, O., et al. 1998. Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18, 93-103.
- Murinson, B. B. & Guarnaccia, J. B. 2008. Stiff-person syndrome with amphiphysin antibodies: distinctive features of a rare disease. *Neurology*, 71, 1955-8.
- Orban, T. I. & Izaurralde, E. 2005. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, 11, 459-69.
- Park, R. J., et al. 2013. Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J Cell Sci*, 126, 5305-12.

- Peter, B. J., et al. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 303, 495-9.
- Prior, P., et al. 1992. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*, 8, 1161-70.
- Quan, A., et al. 2007. Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamin inhibitors that block endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II. *Mol Pharmacol*, 72, 1425-39.
- Raju, R., et al. 2006. Autoimmunity to GABAA-receptor-associated protein in stiff-person syndrome. *Brain*, 129, 3270-6.
- Romer, W., et al. 2007. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, 450, 670-5.
- Rose, N. R. & Bona, C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*, 14, 426-30.
- Rosin, L., et al. 1998. Stiff-man syndrome in a woman with breast cancer: an uncommon central nervous system paraneoplastic syndrome. *Neurology*, 50, 94-8.
- Roux, A., et al. 2006. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441, 528-31.
- Rungta, R. L., et al. 2013. Lipid Nanoparticle Delivery of siRNA to Silence Neuronal Gene Expression in the Brain. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2, e136.
- Rust, M. J., et al. 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 567-73.
- Sandvig, K., et al. 1989. Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol*, 108, 1331-43.
- Schlossman, D. M., et al. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol*, 99, 723-33.
- Schmid, E. M. & McMahon, H. T. 2007. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature*, 448, 883-8.
- Shupliakov, O., et al. 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, 276, 259-63.
- Skretting, G., et al. 1999. Endocytic mechanisms responsible for uptake of GPI-linked diphtheria toxin receptor. *J Cell Sci*, 112 (Pt 22), 3899-909.

- Solimena, M., et al. 1988. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 318, 1012-20.
- Sommer, C., et al. 2005. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet*, 365, 1406-11.
- Sorkin, A. & Von Zastrow, M. 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 609-22.
- Stimpson, H. E., et al. 2009. Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 20, 4640-51.
- Stowell, M. H., et al. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol*, 1, 27-32.
- Sweitzer, S. M. & Hinshaw, J. E. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93, 1021-9.
- Takei, K., et al. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, 1, 33-9.
- Tomari, Y. & Zamore, P. D. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, 19, 517-29.
- Ungewickell, E., et al. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378, 632-5.
- Veiga, E. & Cossart, P. 2005. Listeria hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 7, 894-900.
- Verstreken, P., et al. 2003. Synaptojanin is recruited by endophilin to promote synaptic vesicle uncoating. *Neuron*, 40, 733-48.
- Verstreken, P., et al. 2008. FM 1-43 labeling of synaptic vesicle pools at the Drosophila neuromuscular junction. *Methods Mol Biol*, 440, 349-69.
- Vicari, A. M., et al. 1989. Plasmapheresis in the treatment of stiff-man syndrome. *N Engl J Med*, 320, 1499.
- Von Kleist, L., et al. 2011. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 146, 471-84.
- Watanabe, S., et al. 2013. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*, 504, 242-7.
- Watanabe, S., et al. 2014. Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*, 515, 228-33.

- Weiss, W. A., et al. 2007. Recognizing and exploiting differences between RNAi and small-molecule inhibitors. *Nat Chem Biol*, 3, 739-44.
- Werner, C., et al. 2016. Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition. *Brain*, 139, 365-79.
- Wessig, C., et al. 2003. Neuropathology and binding studies in anti-amphiphysin-associated stiff-person syndrome. *Neurology*, 61, 195-8.
- Wigge, P., et al. 1997. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 8, 2003-15.
- Wigge, P. & McMahon, H. T. 1998. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci*, 21, 339-44.
- Wu, Y., et al. 2009. Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Acta Med Okayama*, 63, 305-23.
- Yamada, H., et al. 2007. Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis. *Mol Biol Cell*, 18, 4669-80.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Angriffspunkte der Autoantikörper beim SPS	2
Abb. 2 Struktureller Aufbau von Amphiphysin I.....	6
Abb. 3 Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytosemechanismen	7
Abb. 4 Angriffspunkte der small molecule Inhibitoren an der Domänenstruktur von Dynamin	12
Abb. 5 Inhibition der Clathrin TD durch pitstop [®] 2.....	12
Abb. 6 siRNA vermittelter Gen-knockdown	15
Abb. 7 Prinzip der siRNA Transfektion.....	16
Abb. 8 Anlagerungsmuster nach sechsstündiger Inkubation mit h-aAmph-AAK und einem Kontrollantikörper.	36
Abb. 9 Zytotoxizitätsassay mit Dyngo [®] 4a 30 µM.....	37
Abb. 10 Zytotoxizitätsassay mit pitstop [®] 2 15 µM	38
Abb. 11 Zytotoxizitätsassay mit MiTMAB [®]	39
Abb. 12 FM-dye Aufnahme zwei Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition.....	40
Abb. 13 FM-dye Signal zwei Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition .	41
Abb. 14 FM-dye Aufnahme sechs Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition.....	41
Abb. 15 FM-dye Signal sechs Stunden nach Clathrin-, oder Dynamininhibition	42
Abb. 16 Antikörperaufnahme mit und ohne Inhibition von Dynamin I und II	43
Abb. 17 Antikörperaufnahme mit und ohne Inhibition von Clathrin	44
Abb. 18 Etablierung der siRNA-Transfektion mit HiPerFect [®]	46
Abb. 19 Etablierung der siRNA Transfektion mit HiPerFect [®]	47
Abb. 20 Zytotoxizitätsassay mit HiPerFect [®]	48
Abb. 21 Morphologie unbehandelter hippocampaler Neurone.....	49
Abb. 22 Morphologie hippocampaler-Neurone nach siRNA Transfektion mit HiPerFect [®]	49
Abb. 23 Morphologie hippocampaler Neurone nach siRNA-Transfektion mit HiPerFect [®]	50
Abb. 24 Morphologie hippocampaler Neurone nach siRNA-Transfektion mit HiPerFect [®]	50

Abb. 25 Etablierungsversuch der siRNA-Transfektion mit N-TER™	52
Abb. 26 Etablierungsversuch der siRNA-Transfektion mit N-TER™	53
Abb. 27 siRNA Knockdown der MAP-K-1	54

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Versuchsaufbau 1 zur Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect®	24
Tab. 2 Versuchsaufbau 2 zur Etablierung der siRNA-Transfektion mittels HiPerFect®	25
Tab. 3 Versuchsaufbau zur Etablierung der siRNA-Transfektion mit N-TER™	25
Tab. 4 Mock-Kontrollen zum N-TER™ Transfektionsreagenz	26
Tab. 5 Ansatz zur Etablierung der Mm/Hs_MAPK1 siRNA-Transfektion mit N-TER™	26
Tab. 6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	29
Tab. 7 Zellkultur	32
Tab. 8 Qdot®	32
Tab. 9 Small-molecule Inhibitoren	33
Tab. 10 siRNA-Transfektion	33
Tab. 11 RNA Aufreinigung, Reverse Transkription	34
Tab. 12 qPCR Primer	34

LEBENS LAUF

Beruflicher Werdegang

- 10/2019 - heute Assistenzarzt Innere Medizin, Klinikum Konstanz
- 10/2015 – 09/2019 Assistenzarzt Innere Medizin, RoMed Klinikum
Rosenheim
- 05/2009 – 09/2011 Physiotherapeut, Praxis für Physiotherapie Actiwell,
Würzburg
- 07/2007 – 03/2009 Physiotherapeut Remedia Hein & Stief GbR, Zentrum für
ambulante Rehabilitation, Darmstadt

Studium

- 04/2009 – 05/2015 Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg

Berufsausbildung

- 06/2004 – 06/2007 Die Schule für Physiotherapie IFBE med. GmbH, Marburg
Abschluss: staatl. anerk. Physiotherapeut

Schule

- 08/1996 – 06/2003 Max-Planck-Gymnasium, Groß-Umstadt

Konstanz, 08. Juli 2020