

Aus dem Institut für Anatomie und Embryologie
(Prof. Dr. med. C. Viebahn)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss rekombinanter Neuroligine auf die neuronale Reifung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jakob Fenske

aus

Lüneburg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. D. Krueger-Burg

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Ko-Referent/in: Prof. Dr. D. Krueger-Burg

Drittreferent/in: PD Dr. med. dent. S. Sennhenn-Kirchner, MME

Datum der mündlichen Prüfung: 25.07.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss rekombinanter Neuroligine auf die neuronale Reifung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 15. Dezember 2021

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Neuronale Synapsen	1
1.2 Synaptogenese.....	6
1.3 Neuroligine.....	9
1.3.1 Neuroigin 1	11
1.3.2 Neuroigin 2	12
1.3.3 Neuroigin 3	12
1.3.4 Neuroigin 4	13
1.4 Fragestellung.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Geräte und Materialien.....	16
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	17
2.2 Mikrotiterplatten	19
2.3 Hippocampale Zellkulturen.....	20
2.4 Transfektion – Calciumphosphat-Präzipitation	20
2.5 Latrunculin A.....	22
2.6 Synaptotagmin-1 Antikörper-Uptake.....	22
2.7 TrkB-Fc Assay	22
2.8 Fixieren der Zellen.....	23
2.9 Immunfärbung.....	23
2.10 Fluoreszenzmikroskopie	25
2.11 Datenauswertung und statistische Verfahren	25
3 Ergebnisse	28
3.1 Latrunculin A Assay für strukturelle Synapsenreifung nach Expression von rekombinatem Neuroigin 3 und Neuroigin 4.....	28
3.2 Latrunculin A Assay für strukturelle Synapsenreifung nach Expression von rekombinanten Neuroigin 3 und Neuroigin 3-R451C.....	30
3.3 Synaptotagmin-1 Antikörper-Uptake.....	32
3.4 Marker für synaptische Vesikel.....	33
3.4.1 Synaptophysin.....	34
3.4.2 Synapsin.....	36
3.4.3 VGAT und VGlut1.....	38

3.5	Sholl-Analyse	39
3.6	TrkB-Fc Assay	42
3.7	TrkB-Fc Assay unter Zugabe von Latrunculin A	44
3.8	Übersicht der Ergebnisse.....	46
4	Diskussion	47
4.1	Einfluss der Neuroligine auf die strukturelle Reifung aktiver Zonen.....	47
4.2	Einfluss von Neuroliginen auf das Recycling synaptischer Vesikel und vesikelassoziierte Proteine	51
4.3	Neuroligine als Regulatoren der Dendritenmorphologie	54
4.4	Neuroligine im Zusammenspiel mit BDNF	55
4.5	Ausblick	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Latrunculin A Assay nach Expression von NL3 und NL4.....	29
Abbildung 2: Latrunculin A Assay nach Expression von rekombinantem NL3 und NL3- R451C.....	31
Abbildung 3: Synaptotagmin-1 Assay nach Expression von NL3 und NL3-R451C.....	33
Abbildung 4: Synaptophysin als Marker im Latrunculin A Assay nach Expression NL3 und NL3-R451C.....	35
Abbildung 5: Synapsin-1 und -2 als Marker im Latrunculin A Assay für NL3 und NL3-R451C	37
Abbildung 6: VGAT und VGlut1	38
Abbildung 7: Sholl-Analyse	41
Abbildung 8: Effekte von Neuroliginen auf die Anzahl von Synapsen bei Blockade der BDNF-Funktion.....	43
Abbildung 9: Effekte von Neuroliginen auf die strukturelle Reifung von Synapsen bei Blockade der BDNF-Funktion	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien	16
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Lösungen	17
Tabelle 3: Angesetzte Lösungen	19
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide	21
Tabelle 5: Primärantikörper	24
Tabelle 6: Sekundärantikörper	25
Tabelle 7: Statistische Auswertung der Sholl-Analyse	40
Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse	46

Abkürzungsverzeichnis

AMPAR	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptor
ASD	Autismus-Spektrum-Störungen
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
CASK	<i>Calcium/Calmodulin dependent serine protein kinase</i>
CAZ	<i>Cytomatrix at the active zone</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DIV	<i>Days in vitro</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELKS	<i>Glutamine, leucine, lysine and serine-rich protein</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFP-F	Farnesyliertes Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LatA	Latrunculin A
Mint1	<i>Munc-18 interacting protein 1</i>
Munc13	<i>Mammalian homolog of unc-13</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NT-3/-4	Neurotrophin-3/-4
NL1-4/4X/4Y/5	Neuroigin 1-4/4X/4Y/5
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
p75NTR	p75-Neurotrophin-Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pCAG	Cytomegalovirus-beta-Aktin-beta-Globin-Promotor
pCMV	Cytomegalovirus-Promotor
PDZ	<i>PSD-95/Discs large homolog 1/Zonula occludens-1</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
RIM	<i>Rab3-interacting molecule</i>

RIM-BPs	<i>RIM-binding proteins</i>
S-SCAM	<i>Synaptic scaffolding molecule</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TRITC	5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TrkA/B/C	Tropomyosin-Rezeptor Kinasen A/B/C
VAMP-1/-2	<i>Vesicle associated membrane protein-1/-2</i>
VELIs	<i>Vertebrate lin-7 homologues</i>
VGAT	<i>Vesicular GABA transporter</i>
VGlut	<i>Vesicular glutamate transporters</i>
WRC	<i>WAVE-regulatory complex</i>

1 Einleitung

1.1 Neuronale Synapsen

Als wesentliches Organ der Verarbeitung und Speicherung von Sinneseindrücken stellt das zentrale Nervensystem ein vielfältiges und komplex gebautes Netzwerk dar. Durch spezialisierte Zelltypen und eine charakteristische Gewebskonstitution unterscheidet es sich maßgeblich von anderen Organen. Um die Vielzahl von Informationen und Umwelteindrücken zu verarbeiten, benötigt das menschliche Gehirn adäquate Mechanismen. Im Zentrum dieses Systems stehen als Schnittstelle und Kommunikationseinheit zwischen Nervenzellen die neuronalen Synapsen.

Neurone stellen neben Gliazellen den wesentlichen Zelltyp im zentralen Nervensystem dar. Während man verschiedenste Subtypen dieser Zellart unterscheidet, lassen sich grundsätzlich allgemeine strukturelle Merkmale ausmachen. Der Zellkörper eines Neurons wird als Soma oder Perikaryon bezeichnet und beinhaltet neben dem Zellkern weitere Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum, Ribosomen, Mitochondrien und den Golgi-Apparat.

In histologischen Färbungen lassen sich schollenartige Anordnungen im Soma feststellen, welche als Nissl-Schollen bezeichnet werden und das neuronale Korrelat zum rauen, mit Ribosomen besetzten, Endoplasmatischen Retikulum darstellen.

Analog zu Zellen anderer Gewebstypen weisen auch Neurone ein Zytoskelett auf. Man unterscheidet Mikrotubuli (Neurotubuli), Aktinfilamente und Intermediärfilamente (Neurofilamente). Das Zytoskelett dient neben der Stabilisierung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie auch zur Realisierung von Transportprozessen.

Ausgehend vom Soma lassen sich Zellfortsätze ausmachen, welche in Dendriten und Axon unterteilt werden. Die Anzahl an Dendriten und das Ausmaß ihrer Verzweigung unterscheiden sich zwischen den diversen Subtypen der Neurone, während grundsätzlich nur ein Axon pro Zelle ausgebildet ist.

Dendriten dienen dazu, Signale anderer vorgeschalteter Neurone zu empfangen und diese in Richtung des Somas weiterzuleiten. Viele Neurone, darunter auch die Pyramidenzellen der Großhirnrinde, die Purkinjezellen des Kleinhirns und die *Medium spiny neurons* des Striatums, weisen an ihren Dendriten dornenartige Auswüchse auf, die als *Spines* bezeichnet werden. Die *Spines* sind allerdings in ihrer ultrastrukturellen Morphologie nicht identisch, sondern können verschiedene Formen annehmen.

Der Übergang vom Soma zum Axon wird als Axonhügel oder Ursprungskegel bezeichnet, welcher mikroskopisch am Fehlen von Nissl-Schollen auszumachen ist. Entlang des Axons

können durch selektive Aktivität diverser Ionenkanäle Erregungen in Form von Ionenflüssen, sogenannte Aktionspotentiale, in Richtung der Synapsen geleitet werden.

Der Verlauf eines Axons mündet in multiplen präsynaptischen Endigungen. Diese Auftreibungen bilden einen Zell-Zell-Kontakt mit einem Abschnitt eines nachgeschalteten Neurons, welcher als Postsynapse bezeichnet wird. Gemeinsam mit dem als synaptischen Spalt bezeichneten zwischenliegenden extrazellulären Raum, bilden diese beiden Komponenten eine neuronale oder chemische Synapse. Eine solche Synapse kann im zentralen Nervensystem von Astrozytenfortsätze umgeben sein, welche insbesondere nutritive und homöostatische Funktionen erfüllen (Allen und Eroglu 2017).

Das Grundgerüst der Präsynapsen wird durch das Zytoskelett und insbesondere durch Aktinfilamente gebildet (Rust und Maritzen 2015). Zudem lassen sich in präsynaptischen Auftreibungen Mitochondrien und diverse synaptische Vesikel ausmachen (Harris und Weinberg 2012).

Der Bereich der präsynaptischen Membran, der angrenzend an den synaptischen Spalt der postsynaptischen Membran direkt gegenüberliegt, wird als aktive Zone bezeichnet. In diesem Bereich können die in der präsynaptischen Auftreibung enthaltenen synaptischen Vesikel mit der Zellmembran fusionieren und ihre enthaltenen Neurotransmitter in den extrazellulären Raum ausschütten. Das aus mehreren Proteinen gebildete Grundgerüst der aktiven Zone wird im internationalen Sprachgebrauch als *Cytomatrix at the active zone* (CAZ) bezeichnet. Der mittlere Durchmesser dieser Zone beträgt 0,2 bis 0,5 μm (Südhof 2012). Die zentralen Proteine der CAZ sind RIM (Rab3-interacting molecule (Wang et al. 1997)), ELKS (Glutamine, leucine, lysine and serine-rich protein (Nakata et al. 1999)), Munc13 (Mammalian homolog of unc-13 (Brose et al. 1995)), Bassoon (tom Dieck et al. 1998), Piccolo (Cases-Langhoff et al. 1996), auch Aczonin genannt (Wang et al. 1999), und α -Liprin (Serra-Pagès et al. 1995).

Das Protein ELKS wurde mehrmals beschrieben und ist auch unter den Namen CAST(CAZ-associated structural protein (Ohtsuka et al. 2002)), Rab6IP2 (Rab6-interacting protein 2 (Monier et al. 2002)) und ERC (ELKS-Rab6IP2-CAST (Wang et al. 2002)) bekannt.

Diese Proteine übernehmen diverse Aufgaben in der Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion. So dienen Munc13 und RIM unter anderem in der Vorbereitung zur Vesikelexozytose (Augustin et al. 1999; Han et al. 2011), während Bassoon und Piccolo als Gerüstproteine fungieren (Dresbach et al. 2001).

Neben diesen zentralen Proteinen kommen einige andere Moleküle vor, die mit der CAZ assoziiert sind oder mit dieser in Verbindung stehen. Hier sind insbesondere RIM-BPs (RIM-binding proteins (Wang et al. 2000)), Rab3 (Olofsson et al. 1988), der CASK (Calcium/Calmodulin dependent serine protein kinase)-Mint1 (Munc-18 interacting protein 1)-VELIs (Vertebrate lin-7 homologues)-Komplex (Butz et al. 1998) und das Aktin-bindende Protein Profilin zu nennen.

RIM-BPs spielen eine wichtige Rolle in der Bindung zwischen Calciumkanälen und RIM (Südhof 2012), während Profilin die CAZ über Piccolo an Aktin bindet (Wang et al. 1999). Die genaue Funktion des CASK-Mint1-VELIs-Komplexes ist noch nicht geklärt.

Ein weiteres zentrales strukturelles und funktionelles Element der Präsynapse stellen die synaptischen Vesikel dar. Synaptische Vesikel sind membranumgebene Zellkompartimente mit einem mittleren Durchmesser von 38,7 nm in hippocampalen Neuronen der Ratte (Qu et al. 2009). Auf und innerhalb der Vesikelmembran finden sich insbesondere Neurotransmittertransporter und Proteine, die für die Funktion der Vesikel in Hinblick auf die Ausschüttung der Neurotransmitter relevant sind. Zentrale Moleküle sind Synaptobrevin-1 und -2 (Archer et al. 1990), auch als VAMP-1 und -2 (Vesicle associated membrane protein-1/-2) bekannt, Synaptophysin (Ozçelik et al. 1990), die Synaptotagmine, Synaptoporin (Knaus et al. 1990), Rab3A und Rab3B (Zahraoui et al. 1989) sowie die Synapsine. Die Synapsine sind eine Familie von Proteinen, die drei Subtypen, Synapsin-1, -2 und -3, kennt (Kao et al. 1999), während bei den Synaptotagminen 17 Subtypen bekannt sind (Dean et al. 2012).

Synaptische Vesikel liegen in präsynaptischen Auftreibungen in drei Lokalisationen vor. Der Großteil der Vesikel befindet sich im sogenannten *Reserve pool*, während ein deutlich geringerer Anteil in unmittelbarer Nähe zur aktiven Zone liegt. Diese Vesikel gehören zum sogenannten *Readily releasable pool*, welcher ohne intensive Zellstimulation mit der präsynaptischen Membran fusionieren kann.

Der *Reserve pool* kann als eine Art Speicherort für synaptische Vesikel verstanden werden, welche bei intensiver Zellstimulation freigesetzt werden können. Im *Reserve pool* sind die synaptischen Vesikel am Zytoskelett befestigt. Obwohl der Mechanismus nicht abschließend verstanden ist, wird angenommen, dass Synapsin-1 als eine Art regulierendes Verbindungsmolekül zwischen den Vesikeln und dem Zytoskelett agiert (Rizzoli und Betz 2005).

Weitere Vesikel befinden sich im sogenannten *Recycling pool*, welcher ebenfalls unter physiologischer Stimulation fusionieren kann und anschließend direkt durch Vesikel aus dem Prozess des Vesikelrecyclings wieder aufgefüllt wird.

Trifft ein Aktionspotential an einer präsynaptischen Axonterminalen ein, wird die Zellmembran lokal depolarisiert. Dies führt zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumionenkanäle, welche anschließend den Einstrom von Calciumionen ins Zytoplasma ermöglichen. Damit dieser elektrophysiologische Prozess zu einer Exozytose synaptischer Vesikel führen kann, interagieren die einströmenden Calciumionen mit den Synaptotagminen. Synaptotagmine sind vesikuläre Transmembranproteine, die an ihrer zytoplasmatischen Domäne Bindungsstellen für Calciumionen aufweisen (Südhof und Rizo 1996). Kommt es zu einer Bindung, folgt eine Konformationsänderung des Proteins, welche die Interaktion der sogenannten SNARE-Moleküle (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) ermöglicht. Zu den SNAREs werden die vesikulären Proteine

Synaptobrevin-1 und -2 (VAMP-1 und -2) sowie die plasmamembranständigen Proteine SNAP-25 (Synaptosomal associated protein 25 (Oyler et al. 1989)) und die Syntaxine gezählt. Im Zuge der Vesikelexozytose bilden diese Proteine einen stabilen Komplex, den sogenannten SNARE-Komplex, der die Vesikel an die präsynaptische Membran annähert und somit die anschließende Membranfusion ermöglicht. Dieser Prozess mündet in der Ausschüttung der enthaltenen Neurotransmitter in den synaptischen Spalt.

Bezüglich der Mobilisierung von Vesikeln aus dem *Reserve pool* zur Exozytose vermutet man, dass Synapsin-1 als Aktin-bindendes Protein als zentraler Mediator zwischen dem *Reserve pool* und dem Zytoskelett fungiert und somit eine Vermittlerrolle für die Migration der Vesikel in Richtung der aktiven Zone einnimmt. Der angenommene Mechanismus basiert auf der Erkenntnis, dass Synapsin-1 unter anderem bei Calciumioneneinstrom durch die CaMKII (Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II) phosphoryliert werden kann und anschließend seine Fähigkeit Aktin zu binden verliert (Bähler und Greengard 1987; Chi et al. 2003).

Kam es zu einer Ausschüttung von Neurotransmittern, wird das entleerte synaptische Vesikel durch das sogenannte Vesikelrecycling wiederverwertet und erneut mit Neurotransmittern beladen. Grundsätzlich unterscheidet man drei verschiedene Szenarien, die zum Recycling fusionierter Vesikel führen können. Die zeitlich schnellen Mechanismen *Kiss-and-stay* und *Kiss-and-run* beschreiben Situationen, in denen fusionierte Vesikel entweder an der aktiven Zone verbleiben und direkt mit Neurotransmittern neu beladen werden oder per lokaler, Clathrin-unabhängiger Endozytose recycelt werden. Der zeitlich länger dauernde Mechanismus ist die Clathrin-abhängige Endozytose fusionierter Vesikel. Hier wird die Oberfläche der entleerten Vesikel mit Clathrin, Dynamin und weiteren Proteinen besetzt und von der Plasmamembran getrennt. Anschließend werden die Vesikel direkt oder über Fusion mit Endosomen wieder mit Neurotransmittern beladen (Koenig und Ikeda 1996; Sudhof 2004). Hierzu besitzen die Vesikel je nach verwendetem Neurotransmitter entsprechende sekundär aktive Transporter. Die am häufigsten vorkommenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem sind Glutamat an exzitatorischen Synapsen sowie GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glycin an inhibitorischen Synapsen. Die entsprechenden Transporter werden als VGlut (Vesicular glutamate transporters) beziehungsweise als VGAT (Vesicular GABA transporter) bezeichnet. Darüber hinaus existieren diverse andere Neurotransmitter und Transporter, die aber deutlich seltener als die zuvor beschriebenen vorkommen.

Der aktiven Zone unmittelbar gegenübergestellt ist die postsynaptische Membran. Getrennt werden die beiden Kompartimente nur durch den circa 20 nm breiten synaptischen Spalt. Die Kontaktstelle zwischen präsynaptischen Axonterminalen und postsynaptischen Membranen kann axodendritisch, axoaxonal oder axosomatisch sein.

In der postsynaptischen Membran lassen sich vor allem Neurotransmitterrezeptoren ausmachen. Diese Rezeptoren ermöglichen es Neurotransmittern, die präsynaptisch sezerniert wurden, an sie zu binden und leiten anschließend spezifische Reaktionen im Zuge

der Erregungsleitung ein. So können entweder Ionenströme in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus erfolgen (ionotrope Rezeptoren) oder diverse rezeptorabhängige metabolische Reaktionen resultieren (metabotrope Rezeptoren). Die Art der postsynaptischen Rezeptoren ist vom Synapsentyp und vom verwendeten Neurotransmitter abhängig.

In exzitatorischen Synapsen findet sich bei ultrastruktureller Betrachtung eine elektronendichte Zone unterhalb der postsynaptischen Membran, die als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wird. Die PSD ist aus einer Vielzahl an strukturgebenden Gerüstproteinen und Enzymen aufgebaut, welche die postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren und weitere membranständige Proteine fixieren sowie metabolische Funktionen übernehmen (Sheng und Kim 2011). Zentrale Gerüstproteine der PSD sind PSD-95 (Postsynaptic density protein 95 (Cho et al. 1992)), S-SCAM (Synaptic scaffolding molecule (Hirao et al. 1998)), Shanks (SH3 and multiple ankyrin repeat domains proteins (Naisbitt et al. 1999)), Homer (Brakeman et al. 1997) und GKAP (G kinase-anchoring protein (Kim et al. 1997)). Eine strukturelle Gemeinsamkeit, die diese Moleküle aufweisen, ist das Vorhandensein einer typischen Aminosäuresequenz, die als PDZ (PSD-95/Discs large homolog 1/Zonula occludens-1)-Domäne bezeichnet wird (Feng und Zhang 2009). Auch das Enzym CaMKII steht in enger Verbindung mit den Gerüstproteinen und findet sich regulär in PSDs. Die Relevanz der Gerüstproteine der PSD liegt neben der Strukturgebung und Verankerung der Postsynapse insbesondere in der Platzierung der Neurotransmitterrezeptoren. Die gängigen Glutamaterezeptoren NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor) und AMPAR (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionsäure-Rezeptor) können durch Bindung an PSD-95 an der postsynaptischen Membran gehalten werden und somit in direkte Nähe zur Präsynapse gebracht werden (Kornau et al. 1995; Schnell et al. 2002).

Inhibitorische Synapsen weisen einen abweichenden Aufbau der Postsynapse auf. Die zentralen Gerüstproteine sind Gephyrin (Prior et al. 1992), S-SCAM und Collybistin (Kins et al. 2000). Gephyrin geht Bindungen mit Neurotransmitterrezeptoren, Proteinen des Zytoskeletts und Transmembranproteinen ein (Groeneweg et al. 2018) und spielt zudem eine Rolle in der Rekrutierung und Bindung von Neurotransmitterrezeptoren (Pizzarelli et al. 2020). Rezeptoren für die klassisch inhibitorischen Neurotransmitter sind GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren sowie Glycinrezeptoren.

Der Zell-Zell-Kontakt von neuronalen Synapsen wird wie auch in anderen Geweben durch Adhäsionsmoleküle stabilisiert. Dabei finden sich prä- und postsynaptische Moleküle, die miteinander Interaktionen eingehen und so die synaptischen Kontaktstellen zueinander ausrichten. Neben der Funktion der Zellkontaktstabilisierung werden einigen Vertretern zentrale Funktionen in der Bildung von Synapsen zugeschrieben (vgl. Abschnitt 1.2). Bisher wurde eine Vielzahl an beteiligten Molekülen identifiziert, weshalb im Folgenden wesentliche Vertreter beschrieben werden.

Die präsynaptisch lokalisierten Neurexine kommen in drei Isoformen vor, die jeweils als langkettige α - und als kurzkettige β -Variante vorliegen können und intrazellulär an CAZ-Proteine und Synaptotagmine binden können (Hata et al. 1993; Hata et al. 1996). Darüber hinaus existieren multiple gespleißte Versionen der Varianten, die Einflüsse auf die Bindungseigenschaften der Neurexine mit ihren postsynaptischen Interaktionspartnern haben (Reissner et al. 2013). Einer der wichtigsten Bindungspartner der Neurexine sind die postsynaptischen Neuroligine, welche in Abschnitt 1.3 im Detail vorgestellt werden.

Die Cadherine sind eine große Familie von Adhäsionsmolekülen, die insbesondere in der Formation von Adhärenskontakten in diversen Geweben eine Rolle spielen. Cadherine kommen sowohl prä-, als auch postsynaptisch vor und bilden extrazellulär einen homophilen Komplex, der mit intrazellulären Bindungspartnern wie den Cateninen interagieren kann.

Als weitere wichtige Vertreter sind SynCAMs, Teneurine, Latrophiline und Ephrine zu nennen, die in der großen Gruppe der Adhäsionsmoleküle allerdings nur einen Teil ausmachen (Südhof 2018).

1.2 Synaptogenese

Obwohl der Prozess der Synaptogenese zeitlebens stattfinden kann, bildet sich ein Großteil der synaptischen Kontakte im Zuge der Embryonalentwicklung und der postnatalen Periode (Südhof 2018). Nachdem sich eine neuronale Stammzelle während der Embryogenese aus einer embryonalen Stammzelle entwickelt hat, teilt sie sich und bringt sogenannte radiale Gliazellen hervor. Aus diesem Zelltyp entstehen anschließend die postmitotischen Neuroblasten. Nachdem die Neuroblasten an ihren finalen Ort im zentralen Nervensystem migrieren, bilden sie neben den dendritischen Fortsätzen den sogenannten *Growth cone* oder auch Wachstumskegel aus. Dieser bildet das distalste Ende des auswachsenden Axons. Die kegelförmigen Erweiterungen des *Growth cones* werden als Lamellipodien bezeichnet, welche sich zu fingerförmigen Auswüchsen (Filopodien) verzweigen.

Die fortwachsenden *Growth cones* werden vermutlich von Signalen anderer Zellen in der Umgebung geleitet und stimuliert und wachsen dementsprechend in bestimmte Richtungen zu potentiellen Kontaktstellen mit anderen Neuronen. Diese als Chemotaxis bezeichnete Richtungsweisung des *Growth cones* wird durch diverse Moleküle beeinflusst. Bisher konnten unter anderem mit Netrinen, Semaphorinen, Ephrinen, Slits, Neurotrophinen und Neurotransmittern einige dieser Moleküle untersucht werden ohne allerdings die exakten Mechanismen zu klären (Zheng et al. 1994; Mortimer et al. 2008). Man nimmt an, dass die extrazellulären Signale im *Growth cone* verschiedene metabolische Reaktionen initiieren, welche nachfolgend über Aktin-bindende Proteine zu einer Anpassung der räumlichen Anordnung der Aktinfilamente führen und somit die Wachstumsrichtung des Axons bestimmen (Gomez und Letourneau 2014).

Nachdem die initiale Bildung eines Kontaktes zwischen *Growth cone* und Dendrit stattgefunden hat, folgt die Spezifikation der prä- und postsynaptischen Zonen bereits nach kurzer Zeit. Die präsynaptischen Proteine liegen zum Teil bereits vorbereitet in Vesikeln vor, sodass sie bei Bildung eines Kontaktes sofort zur zukünftigen Präsynapse transportiert werden können (Ahmari et al. 2000). Zuerst kommt es zur Akkumulation der CAZ-Proteine, der Calciumionenkanäle und von N-Cadherin, auf welche die Rekrutierung synaptischer Vesikel folgt. Nachdem die präsynaptische Maschinerie angereichert ist, beginnt auch der Transport von Neurotransmitterrezeptoren und Gerüstproteinen zur postsynaptischen Membran (Friedman et al. 2000; Goda und Davis 2003).

Hat sich eine Synapse ausgebildet, ist sie noch nicht vollständig funktionsfähig, sondern muss zuvor Reifungsprozesse durchlaufen. Diese bestehen insbesondere in der transzellulären Stabilisierung der Kontaktstelle, der suffizienten Ausbildung der prä- und postsynaptischen Verdichtungszone und der vollständigen funktionellen Ausreifung.

Kommt es zur Bildung eines Kontaktes zwischen *Growth cone* und einem Dendritenabschnitt, muss dieser Kontakt stabilisiert werden. Meist bildet sich die Kontaktstelle proximal des *Growth cone*, sodass das Axon weiterwachsen kann, während sich an der Kontaktstelle eine Synapse bilden kann. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle dienen unter anderem der Verbindung zweier Zellen und nehmen daher eine wichtige Rolle in der Formation und Stabilisierung von synaptischen Kontakten ein (Batoool et al. 2019). So konnte gezeigt werden, dass Cadherine, insbesondere Cadherin-2 (N-Cadherin), -4 und -6, gemeinsam mit anderen Adhäsionsmolekülen die Differenzierung prä- und postsynaptischer Endigungen induzieren (Yamagata et al. 2018). Darüber hinaus befinden sich Cadherine und ihre intrazellulären Bindungspartner (Catenine) bereits vor der Bildung synaptischer Kontakte in Axonen und Dendriten und reichern sich anschließend an neu gebildeten Synapsen an. Aus diesem Grund wird den Cadherinen eine stabilisierende Rolle auf frühe Synapsen zugeschrieben (Benson und Tanaka 1998).

Die *in vitro* Überexpression von SynCAMs in nicht-neuronalen Zellen führt zur Bildung synaptischer Kontakte mit nahegelegenen Neuronen, was ebenfalls eine Beteiligung dieser Moleküle in der Bildung oder Differenzierung neuer Synapsen nahelegt (Biederer et al. 2002). Zudem spielen SynCAMs eine Rolle in der Steuerung der Wachstumsrichtung von Axonen (Frei et al. 2014).

Besonders die Interaktion zwischen Neuroliginen und Neurexinen ist von grundlegender Bedeutung für die Bildung und Reifung synaptischer Kontakte und der Rekrutierung der prä- und postsynaptischen Maschinerie und wird deshalb im Detail in Abschnitt 1.3 erörtert.

Des Weiteren wird das Wachstum und die Stabilisierung des *Growth cones* sowie die Bildung neuer Synapsen und die Synapsenreifung durch Zell-Matrix-Kontakte beeinflusst. Die zentrale Familie der Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle sind die Integrine, welche die zuvor genannten Funktionen in Neuronen übernehmen (Lilja und Ivaska 2018).

Neurotrophine sind Moleküle, die in neuronalen Geweben sezerniert werden und der Funktion und der Entwicklung von Neuronen zuträgliche Aufgaben übernehmen. Zu dieser Gruppe gehören insbesondere BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), NGF (Nerve growth factor), NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4 (Neurotrophin-4). Die Neurotrophine vermitteln ihre Effekte über p75^{NTR} (p75-Neurotrophin-Rezeptor), TrkA, TrkB und TrkC (Tropomyosin-Rezeptor Kinasen A, B und C). Während alle Neurotrophine an p75^{NTR} binden, interagiert ausschließlich NGF mit TrkA, BDNF, NT-3 und NT-4 mit TrkB und ausschließlich NT-3 mit TrkC.

Obwohl alle Neurotrophine zur Bildung, Reifung und Instandhaltung von Synapsen beitragen (Huang und Reichardt 2001), gehört BDNF zu dem am besten untersuchtesten Vertreter. Man geht davon aus, dass BDNF zum größten Teil aus präsynaptischen Vesikeln insbesondere exzitatorischer Neurone freigesetzt wird und extrazellulär auf die prä- und postsynaptisch lokalisierten TrkB-Rezeptoren wirkt (Dieni et al. 2012; Andreska et al. 2014; Zagrebelsky und Korte 2014). Da es sich bei TrkB um einen Tyrosinkinase-Rezeptor handelt, kommt es bei einer Bindung von BDNF zu einer Dimerisierung und anschließender Phosphorylierung von Tyrosin, welche verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt. So hat BDNF bereits in den frühen Stadien der neuronalen und synaptischen Entwicklung Einfluss auf die chemotaktische Richtungsweisung des *Growth cones* (Song et al. 1997). Darüber hinaus führt die *in vitro* Zugabe von BDNF zur Erhöhung der immunhistochemisch nachweisbaren exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Kontakte sowie zu einem verstärkten Wachstum und Differenzierung von Axonen und Dendriten (Park und Poo 2013). Während die funktionellen präsynaptischen Wirkungen von BDNF über TrkB insbesondere auf die PLC γ (Phospholipase C γ)- und MAPK (Mitogen-activated protein kinase)-abhängige Erhöhung der Vesikelexozytose und -mobilisierung abzielen, scheinen in Postsynapsen vor allem Effekte auf die Signalübertragung durch Neurotransmitterrezeptoren und Einflüsse auf die synaptische Plastizität von Bedeutung zu sein (Zagrebelsky und Korte 2014). Weitere Hinweise auf die fundamentale Wichtigkeit von BDNF im Zuge der neuronalen Entwicklung geben Studien an Mäusen, die zeigten, dass ein Knockout von BDNF zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen und einem frühzeitigem Tod der Tiere führt (Ernfors et al. 1995).

Auf postsynaptischer Seite ist der Prozess der Dendritenbildung und -verzweigung relevant für die spätere Bildung von Synapsen. Allerdings sind bisher zwar diverse korrespondierende Moleküle und Signalwege bekannt, jedoch ist das Zusammenspiel dieser Moleküle und die Initiation der Dendritenbildung noch unklar. Als relevant gelten unter anderem die Wnt-Proteinfamilie sowie Cadherine und Catenine, welche beide einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett haben und so möglicherweise die Zellmorphologie beeinflussen können (Salinas und Zou 2008; Tan et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Modulationen in der Signalgebung von BDNF sowie im Vorhandensein von PSD-95 die Dendritenverzweigung beeinflussen (McAllister et al. 1995; Charych et al. 2006). Vaughn

(1989) postulierte zudem bereits frühzeitig, dass die Dendritenverzweigung von Orten der Synapsenbildung ausgeht (synaptotrope Hypothese), was je nach Aktivitäts- und Reifezustand zumindest für glutamaterge Synapsen belegt werden konnte (Cline und Haas 2008).

Das Entwicklungsstadium einer Synapse in Hinblick auf den Reifegrad kann anhand des F-Aktin-Zytoskeletts bewertet werden. F-Aktin ist die makromolekulare, filamentäre Variante des Proteins, welches aus einzelnen globulären G-Aktinmonomeren besteht. Das Aktinsystem ist hochdynamisch, da ein konstanter Umbau der Filamente erfolgen kann. Hierzu kann G-Aktin am (+)-Ende der Filamente angebaut und am (-)-Ende zeitgleich depolymerisiert werden. Eine Möglichkeit den Einfluss des Aktinzytoskeletts auf Synapsen zu untersuchen, ist die Depolymerisation von F-Aktin durch Latrunculin A. Latrunculin A bindet monomeres G-Aktin und verhindert so dessen Polymerisation an F-Aktinfilamenten. Dieser Prozess stört die Dynamik des Aktinsystems und resultiert effektiv in einer Depolymerisation von Aktin (Coué et al. 1987).

Zhang und Benson (2001) konnten so in grundlegenden Experimenten zeigen, dass Synapsen mit zunehmendem Reifegrad unabhängig vom Aktinzytoskelett werden. Während die Aktindepolymerisation durch Latrunculin A in jungen Kulturen (DIV (*Days in vitro*) 5-6) zu einer mikroskopisch und ultrastrukturell signifikanten Abnahme von synaptischen Vesikeln, CAZ- und PSD-Proteinen führte, war dieser Effekt in mittelalten Kulturen (DIV 10-13) geringer ausgeprägt. In reifen Kulturen (DIV 18-20) waren die prä- und postsynaptischen Strukturen trotz Zugabe von Latrunculin A weitgehend unbeeinflusst. Sie schlussfolgerten daher, dass junge Synapsen aufgrund ihres unzureichenden Reifegrades ohne die Präsenz von F-Aktin nicht stabil genug sind, während ältere Synapsen nahezu vollständig unabhängig von Aktinfilamenten werden.

Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher ungeklärt. Ein diskutierter Erklärungsansatz ist, dass die CAZ-Proteine im Zuge der Reifung vermehrte Bindungen untereinander und mit Rezeptoren, Ionenkanälen und Adhäsionsmolekülen eingehen und somit ein stabiles Netzwerk bilden, das nicht mehr von der Verankerung an F-Aktin abhängt (Zhang und Benson 2001).

1.3 Neuroligine

Neuroligine sind postsynaptische Zelladhäsionsmoleküle, die zusammen mit ihren präsynaptischen Bindungspartnern, den Neurexinen, Funktionen in der Bildung, Reifung und Stabilisierung neuronaler Synapsen übernehmen. Während sich bei Nagern die Isoformen Neuroligin 1 (NL1), Neuroligin 2 (NL2), Neuroligin 3 (NL3) und Neuroligin 4 (NL4) nachweisen lassen, kommt bei Menschen zusätzlich NL4 als X-chromosomale (NL4X) und Y-chromosomale (NL4Y oder NL5) Variante vor. Als Transmembranproteine weisen Neuroligine eine intra- und extrazelluläre Domäne sowie eine Transmembrandomäne

auf. Die kürzere intrazelluläre Domäne besitzt am C-Terminus eine PDZ-Domäne. Der extrazelluläre Teil der Moleküle zeigt eine O-Glykosylierungsregion, eine der Acetylcholinesterase homologe Domäne, zwei Spleißstellen, fünf N-Glykosylierungsregionen und zwei calciumbindende EF-Hand-Domänen (Dean und Dresbach 2006). Neuroligine binden im synaptischen Spalt an die präsynaptischen Neurexine unter Bildung des sogenannten Neuroligin-Neurexin-Komplexes. Zur Bildung des Komplexes bilden zwei Neuroliginmoleküle einen Homodimer, welcher zwei monomere Neurexine unter Bildung eines Heterotetramers bindet. Diese Bindung ist calciumabhängig und kann durch alternatives Spleißen an Neuroliginen und Neurexinen in einer Vielzahl von Bindungsvarianten auftreten (Krueger et al. 2012). Pouloupoulos et al. (2012) fanden zudem heraus, dass NL1 und NL3 gemeinsam Heterodimere generieren können.

Intrazellulär unterscheiden sich die Bindungspartner der Isoformen. Während alle Neuroligine PSD-95 binden (Irie et al. 1997), interagieren nur NL1 und NL2 mit S-SCAM (Sumita et al. 2007). Gephyrin wird von NL1, NL2 und NL3 gebunden und Collybistin von NL2 und NL4 (Pouloupoulos et al. 2009; Soykan et al. 2014).

Die Neuroligine üben primär Funktionen im Zusammenhang mit der Bildung und Reifung von Synapsen aus. Grundsätzlich resultiert eine erhöhte Expression von Neuroliginen in einer vermehrten Bildung von Synapsen (Chih et al. 2005). Dabei lassen sich sowohl eine vermehrte Bildung von exzitatorischen, als auch inhibitorischen Synapsen beobachten (Levinson et al. 2005). Durch eine Studie mit Mäusen, die einen Triple-Knockout von NL1, NL2 und NL3 aufwiesen, wurde belegt, dass sich Synapsen ohne Neuroligine zwar noch bilden können, allerdings eine stark eingeschränkte Funktion aufweisen und die Tiere nach kurzer Zeit versterben (Varoqueaux et al. 2006). Zudem können Neuroligine, die in nicht-neuronalen Zellen künstlich exprimiert werden zur Ausbildung von Synapsen mit nahegelegenen Axonen von Neuronen führen (Scheiffele et al. 2000). Neuroligine scheinen daher vor allem der Reifung von Synapsen zu dienen und ein synaptogenetisches Potential zu besitzen, welches jedoch nicht essentiell für die Bildung von Synapsen ist. Ein weiterer vermittelter Effekt dieser Proteinfamilie ist die Rekrutierung und Organisation der prä- und postsynaptischen molekularen Maschinerie, die vornehmlich im Zusammenspiel mit Neurexinen (Dean et al. 2003; Shipman und Nicoll 2012), aber auch allein durch Neuroligine vermittelt wird (Ko et al. 2009). Zudem sorgen Neuroligine zusammen mit Neurexinen für eine präzise Ausrichtung der postsynaptischen Membran zur aktiven Zone der Präsynapse, um eine effiziente synaptische Übertragung zu gewährleisten (Dean und Dresbach 2006).

Da sich die zelluläre Spezifität, das Ausmaß des Forschungsstandes sowie die pathophysiologische Relevanz der einzelnen Isoformen unterscheidet, werden die Neuroliginsubtypen im Folgenden einzeln vorgestellt.

1.3.1 Neuroligin 1

NL1 kommt spezifisch an exzitatorischen Synapsen vor und gehört neben NL2 zu den am besten untersuchten Isoformen (Song et al. 1999). Studiert man die Funktionen eines Proteins, können sogenannte *Gain-of-function* und *Loss-of-function* Experimente durch Überexpression beziehungsweise durch Knockouts Hinweise geben.

Diverse Studien konnten zeigen, dass die Überexpression von NL1 Effekte auf die Struktur und Funktion von Synapsen hat. So können in den entsprechenden Zellkulturen eine erhöhte Zahl von Synapsen mit einer Latrunculin A resistenten, gereiften aktiven Zone festgestellt werden (vgl. Abschnitt 1.2), die eine erhöhte Anzahl von Synapsin, PSD-95 und Glutamatrezeptoren (AMPA, NMDAR) aufweisen. Das vesikelassoziierte Protein Synaptophysin ist allerdings durch NL1-Überexpression nicht resistent gegen Latrunculin A. Darüber hinaus kommt es zu einer Zunahme der Größe der Vesikelpools und des Recyclings synaptischer Vesikel (Dean et al. 2003; Chubykin et al. 2007; Wittenmayer et al. 2009; Petkova et al. 2018).

Ein Knockout von NL1 resultiert hingegen in gegensätzlichen Effekten. Die gebildeten aktiven Zonen von Synapsen sind instabil und unreif, die Vesikelpools sind verkleinert und die Rekrutierung von Glutamatrezeptoren ist herabgesetzt (Chubykin et al. 2007; Wittenmayer et al. 2009).

Des Weiteren hat NL1 einen rekrutierenden Effekt auf Proteine der Postsynapse exzitatorischer Synapsen. Zeitnah nach der Bildung einer Synapse werden durch NL1 PSD-95 und NMDAR an die postsynaptische Membran transportiert (Barrow et al. 2009). Die gebildete Interaktion zwischen NL1 und PSD-95 führt im Folgenden zur Rekrutierung von AMPAR (Mondin et al. 2011).

Zudem ist bekannt, dass die Effekte der NL1 Überexpression auf die Reifung der aktiven Zonen und der Erhöhung des Vesikelrecyclings vom Neurotrophin BDNF abhängen. Wird sezerniertes BDNF durch eine lösliche Variante des TrkB-Rezeptors entfernt, besteht kein erhöhtes Vesikelrecycling und keine Resistenz gegen Latrunculin A in NL1 überexprimierenden Zellen. Die Relevanz von BDNF im Zusammenhang mit NL1 wird zudem durch Studien an NL1-Knockoutmäusen deutlich. Die Zugabe von BDNF zu Kulturen dieser Mäuse, die kein NL1 exprimieren, konnte die ausbleibende synaptische Reifung an DIV14 kompensieren (Petkova et al. 2018). NL1 scheint also nicht alleinig zur Reifung von Synapsen führen zu können, sondern vermittelt diese Funktionen nur im Zusammenspiel mit BDNF.

Chen SX et al. (2010) konnten darüber hinaus nachweisen, dass Neurexin-NL1-Komplexe die Bildung und Verzweigung von Dendriten beeinflussen können.

Einige seltene Mutationen in NL1 sind mit Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) assoziiert, die allerdings weniger stark untersucht sind als jene in NL3 (vgl. Abschnitt 1.3.3) (Chen SX et al. 2010).

1.3.2 Neuroigin 2

Anders als NL1 ist NL2 ein Vertreter, der ausschließlich an inhibitorischen Synapsen gefunden wird (Varoqueaux et al. 2004). Eine erhöhte Funktion von NL2 durch Überexpression resultiert in einer gesteigerten Funktion und Reifung von inhibitorischen Synapsen (Chubykin et al. 2007; Fu und Vicini 2009). Zudem kann die Erhöhung der Synapsenzahl, die Induktion von Latrunculin A resistenten aktiven Zonen und der erhöhten Rate des Recyclings synaptischer Vesikel beobachtet werden (Petkova et al. 2018).

Hingegen zeigen *Loss-of-function* Experimente, dass ein Knockout von NL2 zu einer Reduktion der Anzahl inhibitorischer Synapsen führt (Liang et al. 2015). Darüber hinaus ist die synaptische Übertragung an ebendiesen Synapsen beeinträchtigt und es lassen sich strukturelle Defekte an inhibitorischen Postsynapsen finden (Babaev et al. 2016). Unmittelbar scheint NL2 dementsprechend vornehmlich eine Wirkung auf die Proteinkomposition von Postsynapsen zu haben. Außerdem ist die Ausprägung der zuvor genannten Defekte teils sehr unterschiedlich in Abhängigkeit von der analysierten Region des zentralen Nervensystems (Ali et al. 2020).

Analog zu NL1 an exzitatorischen Synapsen zeigt NL2 Funktionen im Rahmen der Rekrutierung postsynaptischer Proteine an inhibitorischen Synapsen. Komplexe aus NL2 und Neurexinen führen zur Rekrutierung des Gerüstproteins Gephyrin über Interaktionen mit Collybistin. Anschließend kann es durch diesen gebildeten Komplex zur Rekrutierung von Rezeptoren inhibitorischer Neurotransmitter (GABA, Glycin) kommen (Graf et al. 2004; Poulopoulos et al. 2009; Krueger et al. 2012).

Der Mechanismus der Wirkung von NL2 auf die Struktur, Reifung und Funktion scheint ebenfalls abhängig vom BDNF-Signal zu sein. Bei Entfernung des neuronal sezernierten BDNF aus Kulturen sind die durch NL2 Überexpression vermittelten Effekte der erhöhten Synapsenzahl, des erhöhten Vesikelrecyclings und der Reifung aktiver Zonen deutlich geringer ausgeprägt (Petkova et al. 2018).

Die klinische Relevanz von NL2 findet sich insbesondere in seltenen mutierten Varianten des Proteins, die mit Schizophrenie in Verbindung gebracht werden (Sun et al. 2011).

1.3.3 Neuroigin 3

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Neuroiginen ist über die Isoformen NL3 und NL4 weniger bekannt. NL3 kann sowohl an exzitatorischen (glutamatergen), als auch an inhibitorischen (GABAergen) Synapsen nachgewiesen werden und ist in beiden Fällen je mit NL1 und NL2 assoziiert (Budreck und Scheiffele 2007).

Die strukturellen und funktionellen Veränderungen auf synaptischer Ebene durch Überexpression und Knockouts sind bisher nur geringfügig untersucht. Eine vermehrte Produktion von NL3 führt zur Erhöhung von VGAT, aber nicht von VGlut1 (Fekete et al. 2015) sowie zu einer erhöhten Synapsenzahl (Chih et al. 2004), während ein Knockout in

Verhaltensstudien an Mäusen einen autistischen Phänotyp hervorruft (Radyushkin et al. 2009). Zudem führen NL3 Knockouts zu einer erhöhten Dendritenverzweigung im Bereich von circa 50 bis 100 μm um das Soma (Xu et al. 2019). Die Rolle der Überexpression von NL3 in Bezug auf die Reifung von Synapsen sowie der Zusammenhang der Signalgebung mit BDNF ist bisher nicht bekannt.

Das hauptsächliche Augenmerk in Studien zu NL3 beruht auf der Erkenntnis, dass Mutationen dieses Proteins vorliegen, die in Zusammenhang mit ASD gebracht wurden. Die erste Mutation von NL3, die mit ASD in Verbindung gesetzt wurde, war die R451C-Punktmutation, bei der an Position 451 Arginin (R) durch Cystein (C) ausgetauscht ist (Jamain et al. 2003). Diese Mutation ist bisher am intensivsten studiert worden. So ist bekannt, dass NL3-R451C nur zu einem geringen Teil an die Zelloberfläche transportiert werden kann und stattdessen im Endoplasmatischen Retikulum verbleibt. Der geringe Teil, der an die Zelloberfläche gelangt, kann kaum eine Bindung mit Neurexinen ausbilden und somit die eigentlichen Funktionen des Proteins nicht vermitteln (Chih et al. 2004; Comoletti et al. 2004). Außerdem erhöht NL3-R451C die Dendritenverzweigung und die Aktivität von AMPAR und NMDAR im Hippocampus (Etherton et al. 2011), führt im somatosensorischen Cortex allerdings zu vermehrter Aktivität inhibitorischer Synapsen. Darüber hinaus werden durch NL3-R451C vermehrt VGAT und Gephyrin rekrutiert (Tabuchi et al. 2007).

Ein zentraler Aspekt in der Pathophysiologie von ASD ist eine Störung der sogenannten E/I-Ratio, also dem Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Synapsen (Rubenstein und Merzenich 2003). Es konnte gezeigt werden, dass NL3-R451C in spezifischen Gehirnregionen die E/I-Ratio zu Gunsten von exzitatorischen Synapsen verschiebt und somit pathomechanistische Eigenschaften von ASD aufweist (Cellot und Cherubini 2014).

Weitere bekannte ASD-assoziierte Mutationen in NL3 sind P514S, R597W (Quartier et al. 2019), G426S (Xu et al. 2014) und V321A (Yu et al. 2013).

1.3.4 Neuroligin 4

Das Vorkommen von NL4 unterscheidet sich zwischen Nagern und Menschen. Während Nager nur eine NL4 Variante aufweisen, besitzen Menschen eine X- und eine Y-chromosomale Variante (NL4X und NL4Y oder NL5). NL4X und NL4Y weisen eine Ähnlichkeit von 97%, weshalb sie oftmals nahezu synonym verwendet werden (Bemben et al. 2015).

Über die genaue Funktion von NL4 ist bisher ähnlich wie für NL3 nur wenig bekannt. Obwohl durch Studien an Mäusen über längere Zeit angenommen wurde, dass NL4 exklusiv an inhibitorischen Synapsen in der Retina, im Hirnstamm und im Rückenmark lokalisiert ist (Hoon et al. 2011), legen neue Studien nahe, dass humanes NL4 an exzitatorischen Synapsen vorkommt (Marro et al. 2019). Grundsätzlich ist NL4 unter physiologischen Bedingungen nur in geringem Ausmaß exprimiert (Varoqueaux et al. 2006).

Überexpression von NL4 resultiert in einer erhöhten Synapsenzahl (Zhang et al. 2009; Marro et al. 2019) und in verminderter exzitatorischer synaptischer Übertragung (Chanda et al. 2016). Hingegen induziert ein Knockout von NL4 eine defizitäre Übertragung an inhibitorischen Synapsen sowie einen ASD-Phänotyp in Mäusen (Jamain et al. 2008; Hoon et al. 2011).

Analog zu NL3 konzentrieren sich Studien zu NL4 insbesondere auf ASD-assoziierte Mutationen. Innerhalb der Neuroligine finden sich in NL4 die meisten Mutationen. So konnten bisher 16 verschiedenen Mutationen identifiziert werden, die mit ASD in Zusammenhang stehen und weitere, die andere neurologische Pathologien verursachen (Trobiani et al. 2020).

Unter den mehrfach untersuchten Mutationen finden sich D396X, R87W und R704C. Bekannte Effekte sind unter anderem die analog zu NL3-R451C auftretende Retention von R87W am Endoplasmatischen Retikulum sowie die Erhöhung der exzitatorischen Synapsenzahl und der gesteigerten exzitatorischen synaptischen Übertragung durch R704C (Jamain et al. 2003; Zhang et al. 2009; Chanda et al. 2016; Marro et al. 2019).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Vielzahl an Studien zu Neuroliginen und den begleitenden Mutationen bereits umfangreiche Funktionen, Lokalisationen und klinisch relevante Eigenschaften aufdecken konnten. Nichtsdestotrotz bleiben grundlegende Aspekte insbesondere für NL3 und NL4 unklar oder umstritten und bedürfen weiterer Untersuchungen.

1.4 Fragestellung

Isoformen der Neuroligine übernehmen unter physiologischen Bedingungen diverse Funktionen im Rahmen der Genese und Reifung von Synapsen. Zeitgleich sind Mutationen einiger Isoformen mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen assoziiert. Obwohl bereits viele strukturelle und mechanistische Eigenschaften dieser Proteinfamilie untersucht werden konnten, bleiben insbesondere für NL3, NL4 und die Mutation NL3-R451C einige grundlegende Funktionen ungeklärt.

Basierend auf den Ergebnissen von Petkova et al. (2018) und Wittenmayer et al. (2009) ist das Ziel dieser Arbeit die Fragestellung zu klären, ob und inwieweit die Überexpression von NL3, NL3-R451C und NL4 in hippocampalen Neuronen einen Einfluss auf die Anzahl und strukturelle Reifung von Synapsen bzw. der CAZ im Sinne einer Unabhängigkeit vom Aktinzytoskelett führt. Zudem wird für NL3 und NL3-R451C ein weiteres Experiment durchgeführt, um zu untersuchen ob es durch eine Überexpression zu einem erhöhten Recycling synaptischer Vesikel kommt und die zuvor genannten Neuroliginvarianten somit einen Einfluss auf die funktionelle Reifung von Synapsen haben.

Bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C wird ergänzend das Verhalten von Markern synaptischer Vesikel getestet. Dieses Experiment soll Aufschluss darüber geben, ob neben den Proteinen der CAZ auch die Anzahl und die Aktinunabhängigkeit vesikelassoziierter Moleküle beeinflusst werden.

Darüber hinaus werden die mikroskopisch akquirierten Daten der NL3- und NL3-R451C-überexprimierenden Zellen morphologisch untersucht. Hier wird durch eine strukturelle Analyse geprüft, ob durch Überexpression dieser Neuroligintypen ein veränderter Zellphänotyp im Sinne eines unterschiedlich stark verzweigten Dendritenbaums hervorgerufen wird, da diesbezüglich bisher nur Knockoutstudien vorliegen.

Abschließend wird durch ein weiteres Experiment geprüft, ob die durch NL3 und NL3-R451C vermittelten Effekte in Hinblick auf die mögliche Erhöhung der Synapsenzahl und der Aktinunabhängigkeit vom Neurotrophin BDNF abhängen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Cell Strainer 100 µm Nylon	Corning
Coverslips (Deckgläschen)	Glaswarenfabrik Karl Hecht
DRS-12 (Schaukelplatte)	Elmi
Eclipse TS100 Inversmikroskop	Nikon
Eppendorf-Tubes 2 ml	Eppendorf
Falcon sterile 24 Well Multiwellplatte	Corning
Falcon-Tube 50 ml	Greiner Bio-One
Falcon-Tube 15 ml	Greiner Bio-One
Falcon Tissue Culture Dish 100x20 mm	Corning
Glas-Pasteurpipette	Brand
Heracell 150 (Inkubator)	Thermo Fisher Scientific
Herasafe (Workbench)	Thermo Fisher Scientific
MZ75 Stereomikroskop	Leica
Menzelgläser 76x26 mm	Thermo Fisher Scientific
Microcentrifuge Tube 1,7 ml	Mettler Toledo
Mikrolance 3 0,9x40 mm (Kanüle)	Becton Dickinson
Mikrolance 3 0,5x25 mm (Kanüle)	Becton Dickinson
Mikroskop Axio Imager.Z2	Carl Zeiss
Orca Flash 4.0 (Mikroskopkamera)	Hamamatsu
Parafilm M	Bemis
Pinzette abgewinkelt	Fine Science Tools

Bezeichnung	Hersteller
Pinzette gerade	Fine Science Tools
Pipette 10 ml	Sarstedt
Pipetten 1000 µl, 100 µl, 10 µl, 2,5 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 1250 µl, 200 µl, 10 µl	StarLab
Pipette Pipet-Lite XLS	Mettler Toledo
Pipetus reddot	Hirschmann
Schere	Fine Science Tools
Spritze 10 ml	Becton Dickinson
Thermostatschrank	Aqualytic
Vacusaft (Vakuumpumpe)	Integra
Vibramax 100 (Rüttelplatte)	Heidolph
Vortex Genius 3	IKA

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO)	Merck
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
B27	Thermo Fisher Scientific
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser (dH ₂ O)	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck

Bezeichnung	Hersteller
Glucose	Merck
Glycerin	Carl Roth
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Latrunculin A (LatA)	Tocris
L-Glutamin	PAN-Biotech
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Mowiol	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	NeoFROXX
Neurobasalmedium	Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicilin-Streptomycin	PAN-Biotech
Phosphate Buffered Saline (PBS), 10x Premixed	Roche
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Rekombinantes humanes TrkB-Fc	R&D Systems
Sucrose	NeoFROXX
Tris-Cl	NeoFROXX
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich
TritonX-100	Merck
Trypan Blue Stain 0,4%	Thermo Fisher Scientific
Trypsin	PAN-Biotech

Tabelle 3: Angesetzte Lösungen

Lösung	Bestandteile
Depolarisationspuffer	3,75 g NaCl, 5,32 g KCl, 0,29 g CaCl ₂ , 0,2 g MgCl ₂ , 4,76 g HEPES, 6 g Glucose, auffüllen auf 100 ml mit dH ₂ O
Mowiol + 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO)	0,2 M Tris-Cl, 2,5% DABCO, dH ₂ O, Mowiol, Glycerin
Primärantikörper-Blockierungspuffer	PBS mit 10% FCS, 5% Sucrose, 2% BSA, 0,3% TritonX-100
Sekundärantikörper-Blockierungspuffer	PBS mit 5% Sucrose, 2% BSA, 0,3% TritonX-100
Transfektionspuffer (pH = 7,05)	5 g HEPES, 1,35 g Glucose, 0,095 g Na ₂ HPO ₄ , 0,37 g KCl, 8 g NaCl, auffüllen auf 500 ml dH ₂ O
Verdünntes Phosphate Buffered Saline (PBS)	1 ml PBS in 9 ml zweifach destilliertem Wasser

2.2 Mikrotiterplatten

Die Zellkulturen wurden in 24-Well-Mikrotiterplatten angelegt, welche zuvor vorbereitet werden mussten. Hierzu wurden sterile Deckgläschen mit einer Vakuumpumpe angesaugt und in die Wells gegeben. Im Anschluss daran wurden pro Well 500 µl steriles dH₂O pipettiert und die Deckgläschen leicht heruntergedrückt, um eine Bildung von Luftblasen am Boden der Wells zu verhindern. Die Mikrotiterplatten lagerten über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Am Folgetag wurde eine Lösung aus 50 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) und 2 ml Polyethylenimin (PEI) vorbereitet. Daraufhin wurde das Wasser aus den Wells abgesaugt und durch je 500 µl der Lösung ersetzt. Die Beschichtung der Deckgläschen mit PEI dient dazu, die später ausplattierten Zellen an der Oberfläche der Deckgläschen haften zu lassen (Rüegg und Hefti 1984), sodass sie der späteren mikroskopischen Analyse zugänglich sind. Nachdem die Mikrotiterplatten im Anschluss 60 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelagert wurden, folgte das gänzliche Absaugen der Flüssigkeit und das Ersetzen durch 500 µl DPBS. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Am Ende dieses Waschvorgangs wurden 500 µl DPBS in den Wells belassen. Die Mikrotiterplatten lagerten bis zum Anlegen der Zellkultur im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

2.3 Hippocampale Zellkulturen

Um die benötigten Neurone für die Experimente zu akquirieren, wurden Zellkulturen aus Hippocampi von E19-Wistar-Rattenembryonen angelegt.

Die Präparation der Hippocampi geschah in einer Petrischale mit kalter Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) unter Zuhilfenahme von Pinzetten. Die isolierten Hippocampi konnten anschließend in HBSS in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und drei Mal mit HBSS gewaschen werden. Es wurden 2 ml Hippocampussuspension belassen.

Es folgte die Zugabe von 200 μ l Trypsin zur Hippocampussuspension und eine zwanzigminütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die Beendigung der Trypsinierung erfolgte durch erneutes dreimaliges Waschen mit HBSS.

Nun wurden 2 ml der Zellsuspension entnommen und durch mehrmaliges Aufziehen und tröpfchenweises Ablassen durch Kanülen zwei verschiedener Durchmesser mechanisch dissoziiert. Die erhaltene Suspension wurde durch ein Sieb in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben.

Zur Überprüfung der Zellviabilität wurden 10 μ l der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und in einer Zählkammer unter dem Mikroskop analysiert. Es wurden die lebenden Zellen, jene die nicht von Trypanblau gefärbt wurden, ausgezählt.

Parallel wurde ein Zellkulturmedium aus 50 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum (FCS) sowie 500 μ l L-Glutamin angesetzt.

Aus der ermittelten Zellanzahl konnte nun das benötigte Volumen an Zellsuspension und Kulturmedium errechnet und angelegt werden, um die gewünschte Dichte von 50.000 bis 70.000 Zellen pro Well zu erreichen.

Im Anschluss wurde das DPBS aus den vorbereiteten Mikrotiterplatten gänzlich abgesaugt und durch 500 μ l der angelegten Zellkultursuspension pro Well ersetzt. Die Zellkulturen wurden umgehend im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das Ersatzmedium bestand aus 50 ml Neurobasalmedium mit 1% Penicillin-Streptomycin, 500 μ l L-Glutamin und 1 ml B27. Je Well wurden 500 μ l des Ersatzmediums pipettiert.

2.4 Transfektion – Calciumphosphat-Präzipitation

An DIV 3 erfolgte die Transfektion der Zellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Diese Transfektionsmethode besteht im Wesentlichen aus einer angesetzten Transfektionslösung, welcher die zu transfizierende DNA hinzugegeben wird. In der Lösung präzipitieren durch Zugabe von Calciumchlorid und Natriumhydrogenphosphat Calciumphosphatkristalle, an

welche die DNA adsorbiert wird. Nachdem die Zellen mit der Lösung in Kontakt gebracht werden, nehmen sie die DNA-Präzipitate auf (Graham und van der Eb 1973).

Im ersten Schritt wurde das Ersatzmedium gänzlich aus den Wells abpipettiert, separat gelagert und umgehend durch 500 µl Opti-MEM substituiert. Im Anschluss erfolgte die erneute Lagerung der Mikrotiterplatten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Es schloss sich das Anlegen einer Transfektionslösung für die jeweiligen zu transfizierenden Plasmide an. Es wurden die NL3- und NL4-DNAs, eine NL3-R451C-Mutation sowie ein farnesyliertes Konstrukt des Grün fluoreszierenden Protein (GFP-F) als Kontrolle verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
GFP-F	pCMV-Vektor, farnesyliertes GFP
HA-NL3	pCMV-Vektor, humanes NL3 mit HA (Hämagglutinin)-Tag
HA-NL3	pCAG-Vektor, humanes NL3 mit HA-Tag (Chih et al. 2004)
HA-NL3-R451C	pCAG-Vektor, humanes NL3 mit HA-Tag und R451C-Mutation (Chih et al. 2004)
NL4-Venus	pCMV-Vektor, humanes NL4 mit Venus-Tag

pCMV: Cytomegalovirus-Promotor, pCAG: Cytomegalovirus-beta-Aktin-beta-Globin-Promotor

Die Lösung wurde für die gewünschte Anzahl Wells berechnet, wobei sich ein Ansatz für drei Wells aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 5,6 µl Calciumchlorid (CaCl₂), 3 µg DNA, 45 µl Transfektionspuffer. Der Ansatz für drei Wells wurde auf 90 µl Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser (dH₂O) aufgefüllt. Bevor die Transfektionslösung auf die Wells pipettiert werden konnte, musste die Lösung für 20 Minuten im Dunkeln gelagert werden. Daraufhin wurden je Well 30 µl der Lösung pipettiert und die Mikrotiterplatten zur einstündigen Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Anschließend wurde sämtliches Medium abpipettiert und pro Well durch 1 ml Neurobasalmedium, welches zuvor im Inkubator bei 37°C und 10% CO₂ lagerte (Jiang und Chen 2006), ersetzt. Nachdem dieser Ansatz weitere 20 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubierte, wurde das Neurobasalmedium abermals abgesaugt und durch das ursprünglich entnommene Ersatzmedium substituiert.

2.5 Latrunculin A

Um die strukturelle und morphologische Reifung der Neurone unter Aktindepolymerisation zu testen (vgl. Abschnitt 1.2), wurden einige transfizierte Zellen an DIV 5 mit Latrunculin A behandelt. Pro Well wurden 0,5 µl in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes Latrunculin A pipettiert, um eine Zielkonzentration von 2,5 µmol/l in Lösung zu erhalten. Als Kontrolle wurden weitere Wells mit dem gleichen Volumen DMSO ohne Latrunculin A behandelt. Anschließend wurden die Zellkulturen für sechs Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelagert und im Folgenden sofort fixiert.

2.6 Synaptotagmin-1 Antikörper-Uptake

Des Weiteren sollte die funktionelle Reifung der transfizierten Neurone im Sinne eines erhöhten Vesikelrecyclings überprüft werden. Hierzu wurde ein Antikörper (mouse-anti-Synaptotagmin-1, Synaptic Systems) gegen die luminaire Domäne des vesikelassoziierten Proteins Synaptotagmin-1 im Verhältnis 1:600 in einem Depolarisationspuffer gelöst. Der kaliumreiche Puffer diente zur Stimulation der Zellen vermehrten Vesikelumsatz zu betreiben. Im Zuge des Vesikelrecyclings wurde der Antikörper in die präsynaptische Zelle aufgenommen. Pro Well wurden an DIV 5 200 µl des verdünnten Antikörpers auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen drei Mal mit 750 µl erwärmten Neurobasalmedium gewaschen und im Anschluss direkt fixiert. Um den zellulären Vesikelumsatz mikroskopisch sichtbar zu machen, wurde der aufgenommene Antikörper gegen Synaptotagmin-1 im Zuge der Immunfärbung mit einem Sekundärantikörper gefärbt (vgl. Abschnitt 2.9) (Riemann et al. 2018).

2.7 TrkB-Fc Assay

Um im Zellkulturmedium befindliches BDNF zu binden, wurde TrkB-Fc verwendet, eine lösliche, rekombinante Form des humanen BDNF-Rezeptors TrkB. Die Bezeichnung „TrkB-Fc“ deutet an, dass es sich um ein künstlich hergestelltes Fc-Fusionsprotein handelt. Hierbei wurde der extrazelluläre Teil des TrkB-Rezeptors mit der konstanten Region (Fc) eines Immunglobulin G-Antikörpers fusioniert, sodass der Rezeptoranteil auch in löslicher Form BDNF binden kann (Croll et al. 1998). Dadurch wird die Bindung von BDNF an seinen eigentlichen Rezeptor und die Aktivierung der BDNF-abhängigen Signalkaskaden in den Nervenzellen verhindert. An DIV 4 erfolgte die Zugabe von 18 µl des in DPBS gelösten TrkB-Fc zu den Wells, welcher bis zum Fixieren an DIV 5 dort belassen wurde. Bei den mit TrkB-Fc behandelten Wells wurde nach der Transfektion ein Volumen von 450 µl Medium belassen, um die Zielkonzentration von 4 µg/ml in der Lösung zu erhalten. Der TrkB-Fc sollte das zellulär sezernierte BDNF binden und somit dessen Wirkung auf die Zelle abschwächen. Als Kontrolle dienten Wells, zu denen lediglich das Lösungsmittel DPBS gegeben wurde. Das TrkB-Fc Assay wurde zusätzlich in Kombination mit Latrunculin A

durchgeführt. Das Vorgehen erfolgte analog zum Verfahren aus Abschnitt 2.5, allerdings wurde den Wells zusätzlich wie zuvor beschrieben 18 μ l gelöstes TrkB-Fc hinzugefügt.

2.8 Fixieren der Zellen

Das Fixieren der Zellen erfolgte an DIV 5 nach vorheriger Applikation von Latrunculin A bzw. des Synaptotagmin-1 Antikörpers. Die Fixierlösung bestand aus 4% Paraformaldehyd (PFA) in DPBS. Das Zellkulturmedium wurde gänzlich aus den Wells abgesaugt und durch 300 μ l der Fixierlösung ersetzt. Die Neurone blieben durch die PEI-Beschichtung (vgl. Abschnitt 2.2) auf den Deckgläschen haften.

Nach zwanzigminütiger Inkubation wurde die Fixierlösung abgesaugt und es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang mit verdünntem Phosphate Buffered Saline (PBS) an. Die Deckgläschen wurden nun erneut leicht mit PBS bedeckt, um eine Austrocknung zu verhindern.

Anschließend wurden die Mikrotiterplatten auf einer schaukelnden Platte im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.9 Immunfärbung

Um gewünschte Strukturen in Zellen spezifisch anzufärben und mikroskopisch zu betrachten, macht man sich das Prinzip der Immunfluoreszenz zunutze. Die Immunfluoreszenz ist ein immunhistochemisches Verfahren, das auf der spezifischen Färbung von Proteinen oder anderen zellulären Strukturen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern beruht. Zunächst werden Primärantikörper ausgewählt, welche an Epitope der gewünschten zellulären Struktur binden. Bei der Bezeichnung dieser Antikörper wird stets angegeben, in welcher Spezies die Antikörper produziert wurden. Im Anschluss werden die konstanten Regionen der Primärantikörper von Sekundärantikörpern erkannt. Die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper können im Folgenden per Fluoreszenzmikroskopie detektiert und ausgewertet werden. Um die Spezifität der Bindung zu gewährleisten, müssen die Sekundärantikörper immer gegen die Spezies gerichtet sein, in welcher der Primärantikörper produziert wurde.

Die Primärantikörper wurden in individueller Verdünnung in einem Primärantikörper-Blockierungspuffer gelöst. Dabei wurde die Mischung für die gewünschte Anzahl zu färbender Wells berechnet. Pro Well wurden dabei 200 μ l der Lösung benötigt. Die Färbung der zuvor fixierten Zellen erfolgte am gleichen Tag. Bevor die Antikörperlösung hinzugegeben werden konnte, musste sämtliches PBS aus den Wells abgesaugt werden. Die Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank auf einer schaukelnden Platte.

Die Primärantikörper gegen GFP und den HA-Tag dienten zur späteren fluoreszenzmikroskopischen Detektion der mit den Plasmiden transfizierten Neurone. Darüber hinaus wurden weitere Primärantikörper gegen die präsynaptischen Proteine Bassoon, Synaptophysin, Synapsin-1 und -2, VGAT und VGlut1 verwendet, um unterschiedliche Aspekte im Zuge der Datenauswertung quantifizieren zu können (Tabelle 5).

Tabelle 5: Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Bassoon	Mouse	1:1000	Enzo
HA-Tag	Rabbit	1:1000	Abcam
GFP	Rabbit	1:5000	Abcam
Synaptotagmin-1	Mouse	1:600	Synaptic Systems
Synaptophysin	Mouse	1:1000	Synaptic Systems
Synapsin-1/-2	Chicken	1:1000	Synaptic Systems
VGAT	Chicken	1:1000	Synaptic Systems
VGlut1	Guinea Pig	1:1000	Synaptic Systems

Am Folgetag wurden die Sekundärantikörper ausgewählt und in einem Sekundärantikörper-Blockierungspuffer gelöst. Die Primärantikörper wurden aus den Wells abgesaugt, drei Mal mit verdünntem PBS gewaschen und durch 200 µl der Sekundärantikörperlösung ersetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation abgedeckt bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte.

Anschließend wurde die Lösung gänzlich abgesaugt und es folgten drei Waschgänge mit verdünntem PBS. Zwischen den Waschgängen musste jeweils ein Abstand von fünf Minuten eingehalten werden.

Neben den spezifischen Sekundärantikörpern wurde zur Färbung des zellulären Aktingerüsts TRITC(5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-gekoppeltes Phalloidin verwendet (Tabelle 6), welches mit F-Aktin eine irreversible Bindung eingeht. Diese Färbung diente zum Nachweis der Aktindepolymerisation durch das applizierte Latrunculin A.

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Antigen/Farbstoff	Spezies	Verdünnung	E _{max} [nm]	Hersteller
Mouse	Donkey	1:500	650	Dianova
TRITC-Phalloidin	-	1:6000	550	Sigma-Aldrich
Rabbit	Goat	1:1000	495	Invitrogen
Chicken	Rabbit	1:500	550	Jackson ImmunoResearch
Guinea Pig	Goat	1:500	650	Jackson ImmunoResearch

E_{max}: Exzitationsmaximum

Die Deckgläschen wurden im Folgenden aus den Wells entnommen und auf Menzelgläsern platziert. Um eine Fixierung der Deckgläschen zu gewährleisten, erfolgte die Befestigung mit 10 µl Mowiol+DABCO.

2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte im Mikroskop Imager.Z2 (Carl Zeiss) unter Zuhilfenahme der korrespondierenden Software ZEN Blue (Carl Zeiss). Zur Aufnahme von Bildern wurde eine am Mikroskop befestigte Kamera verwendet (Orca Flash 4.0, Hamamatsu) und eine 40-fache Vergrößerung in einem Öl-Immersions-Objektiv gewählt. Darüber hinaus wurde die Belichtungszeit der Präparate für die zu quantifizierenden Fluoreszenzkanäle stets konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.11 Datenauswertung und statistische Verfahren

Die durch Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Bilder der unterschiedlich transfizierten und behandelten Neurone wurden hinsichtlich verschiedener Aspekte analysiert. Hierzu wurden unterschiedliche Analyseverfahren verwendet, um die Wirkung der Latrunculin A-Behandlung, die Intensität des Synaptotagmin-1-Antikörper-Uptakes, die Effekte des TrkB-Fc Assays, die Verteilung der Synapsenmarker sowie Unterschiede in der Zellmorphologie zu quantifizieren. Generell wurde jedes Experiment dreimal auf identische Art und Weise durchgeführt und je analysierter Zellpopulation ein Umfang von mindestens 30 Stichproben erhoben.

Um die Dichte an Synapsen pro Dendritenabschnitt festzustellen, wurden die Aufnahmen der Neurone im Programm OpenView (Noam Ziv, Technion Israel Institute of Technology) ausgewertet. Nach manueller Bestimmung des *Threshold* und der *Delta Intensity* erfasste das Programm die Fluoreszenzsignale automatisch. Korrelierte ein Bassoon-Signal mit der Lage eines Dendriten, wurde dieses als Synapse gewertet und gezählt. Im Anschluss wurde die

Gesamtdendritenlänge des Bildausschnittes im Open-Source-Programm ImageJ (Schneider et al. 2012) gemessen. Abschließend wurde in Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation) die Anzahl aller Bassoon-Punkte durch die Dendritenlänge eines Neurons geteilt und das erhaltene Verhältnis mit zehn multipliziert. Die so erhaltene Dichte an Bassoon-Punkten pro 10 μm Dendritenabschnitt wurde unter den transfizierten Zellgruppen verglichen. Die Auswertung der mit Latrunculin A und TrkB-Fc behandelten Neurone sowie die Färbungen der Synapsenmarker (Synaptophysin und Synapsin) erfolgte auf identische Art und Weise.

Um zu testen ob die erhaltenen Werte statistisch signifikante Unterschiede aufweisen, wurden die errechneten Mittelwerte in der Statistiksoftware Prism (Graph Pad Software) und Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation) analysiert. Als Grundlage für die statistischen Verfahren wurden die Daten mittels Quantil-Quantil-Plot (Q-Q-Plot) auf Normalverteilung überprüft. Nachdem diese für alle Zellgruppen bestätigt werden konnte, schloss sich eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) bei einem Signifikanzniveau von 5% mit nachfolgendem *Bonferroni post-hoc-Test* an.

Die Quantifizierung der Intensität des Synaptotagmin-1-Antikörper-Uptakes wurde ebenfalls in OpenView durchgeführt. Hierzu wurde nach Setzen des *Threshold* und der *Delta Intensity* die relative Intensität der automatisch detektierten Synaptotagmin-1-Signale gemessen. Die resultierenden Mittelwerte wurden anschließend zwischen den transfizierten Zellgruppen verglichen. Die mittlere Intensität der Hintergrundfluoreszenz wurde an mehreren Punkten der analysierten Bilder bestimmt und von den erhaltenen Mittelwerten abgezogen. Da nicht alle erhaltenen Daten eine Normalverteilung aufwiesen, wurde zur statistischen Auswertung der *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Mittelwerte der einzelnen Gruppen durch den *Dunn's post-hoc-Test* analysiert.

Des Weiteren wurden die NL3- und NL3-R451C-transfizierten Zellen auf morphologische Unterschiede zu den GFP-F-transfizierten Kontrollzellen untersucht. Die Neurone wurden hinsichtlich der Verzweigungskomplexität des Dendritenbaumes analysiert. Um die Dendritenverzweigung zu quantifizieren, wurde die Sholl-Analyse in der Open-Source Software Fiji (Schindelin et al. 2012) mit dem Sholl-Analysis-Plugin (Version 4.0.0) (Ferreira et al. 2014) durchgeführt. Die Sholl-Analyse ist ein Verfahren, bei dem eine zuvor definierte Anzahl von Kreisen mit aufsteigenden Radien um einen gemeinsamen Mittelpunkt konstruiert werden (Sholl 1953). Anschließend werden an jedem Kreis die Kreuzungspunkte von Zellfortsätzen mit dem Kreis automatisch gezählt. Das Ergebnis der Analyse wird in einem Diagramm aufgetragen, bei der die Anzahl von Kreuzungspunkten zwischen Kreisen und Zellfortsätzen dem Abstand vom Kreismittelpunkt gegenübergestellt werden.

Als Kreismittelpunkt wurde hier das Zentrum des Somas eines Neurons gewählt. Die Kreise wurden in Radien von 11 bis 50 μm in 1 μm Abständen konstruiert. Für jeden Radius wurde die Anzahl von Kreuzungspunkten ermittelt. Die statistische Auswertung begann mit dem *D'Agostino-Pearson-Test*, um die Normalverteilung der erhaltenen Werte zu überprüfen. Anschließend wurden die ermittelten Werte für jeden Radius einem Signifikanztest

unterzogen. Dabei wurden die Werte für jeden Radius einer Zellgruppe mit den Werten einer anderen Zellgruppe einzeln verglichen. Waren die Werte normalverteilt, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger *t-Test* durchgeführt. Waren die Werte hingegen nicht normalverteilt, wurde der *Mann-Whitney-U-Test* benutzt. Abschließend wurden die erhaltenen Daten in Diagrammform visualisiert.

Zur Erstellung der Abbildungen wurden die Programme Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc.) und Adobe Illustrator CS6 (Adobe Inc.) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Latrunculin A Assay für strukturelle Synapsenreifung nach Expression von rekombinantem Neuroligin 3 und Neuroligin 4

Um die Effekte einer vermehrten Produktion der Proteine NL3 und NL4 in hippocampalen Neuronen von E19-Rattenembryonen zu studieren, wurden die Proteine *in vitro* an DIV 3 überexprimiert und die Zellkulturen an DIV 5 fixiert. Als Kontrolle wurde in einer weiteren Zelle GFP-F überexprimiert. Die Zellen sollten auf die Dichte der Synapsen entlang der Dendriten untersucht werden. Zudem wurden an DIV 5 einige Zellen vor dem Fixieren mit Latrunculin A behandelt, um anschließend zu untersuchen, welchen Effekt die daraus resultierende Aktindepolymerisation auf die Anzahl der Synapsen hat.

Da bekannt ist, dass die anderen Neuroliginvarianten NL1 und NL2 bei Überexpression zu einer Erhöhung der Synapsenzahl führen und zudem die Synapsenzahl durch eine Behandlung mit Latrunculin A bei Überexpression dieser Proteine in jungen Kulturen nicht herabgesetzt wird (Wittenmayer et al. 2009; Petkova et al. 2018), sollte in diesem Experiment getestet werden, ob die Isoformen NL3 und NL4 vergleichbare Effekte induzieren.

Die Kontrollgruppe der mit GFP-F transfizierten Zellgruppen wies nach Fixierung an DIV 5 eine durchschnittliche Synapsenzahl von $0,96 \pm 0,08$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ auf. Im Vergleich dazu führte eine Überexpression von NL3 in den Zellen zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,0001$) der Synapsenzahl auf $1,55 \pm 0,14$ pro $10 \mu\text{m}$. Auch die NL4 überexprimierenden Zellen wiesen eine signifikant ($p < 0,0001$) gesteigerte Synapsenzahl von $1,55 \pm 0,14$ pro $10 \mu\text{m}$ auf.

Vergleicht man die mit Latrunculin A behandelten Zellen der Kontrollgruppe (GFP-F) mit den unbehandelten Zellen, zeigt sich ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied. Applikation von Latrunculin A reduziert die Synapsenzahl hier von $0,96 \pm 0,08$ auf $0,52 \pm 0,07$. Es kann also geschlussfolgert werden, dass die Wirkung von Latrunculin A auch bei den in diesem Experiment verwendeten Kulturen junger Neurone analog zu den Ergebnissen der vorangegangenen Studien zu einer signifikanten Reduktion der Synapsenzahl führt.

Die NL3 überexprimierenden Kulturen, welche mit Latrunculin A behandelt wurden, zeigen mit einer Synapsenzahl von $1,39 \pm 0,12$ keine signifikante Reduktion. Ein ähnliches Ergebnis lässt sich bei Überexpression von NL4 beobachten: hier wird ebenfalls keine signifikante Reduktion der Synapsenzahl durch Applikation von Latrunculin A ($1,36 \pm 0,1$) erreicht.

Es lässt sich anhand der Daten beider Experimente also erkennen, dass eine Überexpression von NL3 oder NL4 an DIV 5 einerseits zu einer signifikant gesteigerten Synapsenzahl führt, andererseits die Synapsen dieser Neurone durch eine Behandlung mit Latrunculin A nicht reduziert werden.

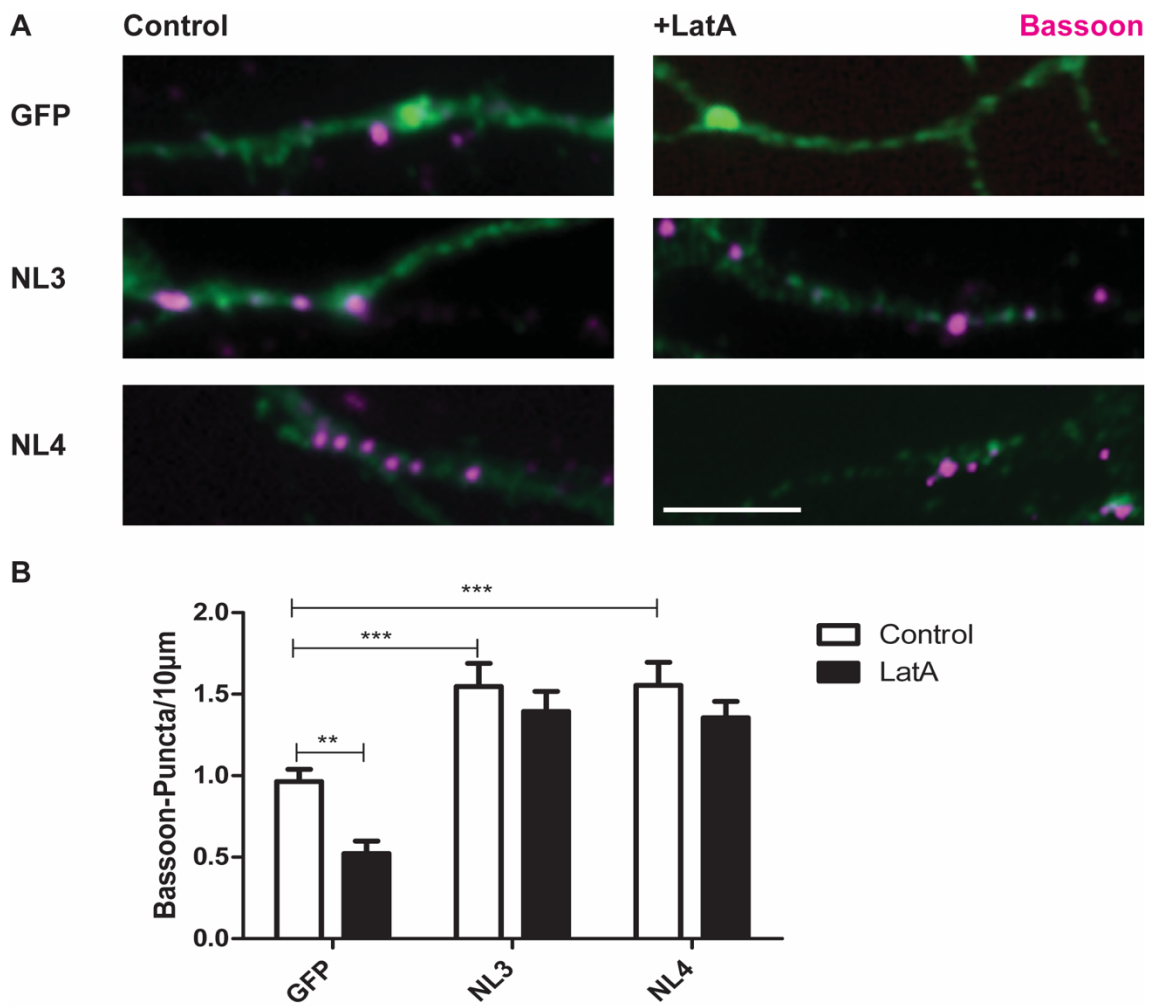


Abbildung 1: Latrunculin A Assay nach Expression von NL3 und NL4 (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und NL4-Venus transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, rechts Ausschnitte aus den Zellpopulationen, die mit Latrunculin A (LatA) behandelt wurden. Die magentafarbene Färbung zeigt Bassoon, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag, Venus) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Für GFP-F lässt sich ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) zwischen der Kontrollgruppe und Latrunculin A-Behandlung ausmachen. Die Kontrollgruppen der NL3- und NL4-Zellen weisen einen signifikanten Unterschied (***) gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe auf. Innerhalb der NL3- und NL4-Kontrollgruppen und Latrunculin A-Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.2 Latrunculin A Assay für strukturelle Synapsenreifung nach Expression von rekombinanten Neuroligin 3 und Neuroligin 3-R451C

Um zu überprüfen, ob die Überexpression einer mutierten Form des NL3 ähnliche oder abweichende Effekte bezüglich der Synapsenzahl und Resistenz gegenüber einer Applikation von Latrunculin A aufweist, wurden Zellkulturen analog zum vorherigen Experiment (vgl. Abschnitt 3.1) mit NL3-R451C transfiziert. Diese Mutation des NL3-Wildtyps weist an Position 451 der Aminosäuresequenz einen Austausch von Arginin (R) zu Cystein (C) auf. Gleichzeitig wurden weitere Zellen mit NL3 und GFP-F als Kontrolle transfiziert.

Die Zellen der GFP-F-Kontrollgruppe zeigten in diesem Experiment ähnliche Ergebnisse zu der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Durchführung. Während die GFP-F-Kontrollzellen eine durchschnittliche Synapsenzahl von $1,05 \pm 0,09$ pro $10 \mu\text{m}$ aufwiesen, führte die Applikation von Latrunculin A zu einer Reduktion der Synapsen auf $0,56 \pm 0,05$ pro $10 \mu\text{m}$. Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Innerhalb der mit NL3 transfizierten Zellen lässt sich mit und ohne Zugabe von Latrunculin A kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Die Kontrollzellen wiesen im Mittel $1,37 \pm 0,11$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ auf, während die Zugabe von Latrunculin A zu einer Synapsenzahl von $1,24 \pm 0,1$ pro $10 \mu\text{m}$ führte.

Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich auch bei Überexpression von NL3-R451C. Hier zeigten die Kontrollzellen eine Synapsenzahl von $1,13 \pm 0,1$ pro $10 \mu\text{m}$. Die Zugabe von Latrunculin A reduzierte die Anzahl der Synapsen auf $0,85 \pm 0,07$ pro $10 \mu\text{m}$. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

Analog zu den beobachteten Ergebnissen aus Abschnitt 3.1, ließ sich auch in diesem Experiment eine signifikant erhöhte Synapsenzahl bei NL3-Überexpression gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe nachweisen. NL3 überexprimierende Zellen wiesen mit $1,37 \pm 0,11$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ gegenüber $1,05 \pm 0,09$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ in der GFP-F-Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Synapsendichte ($p < 0,05$) auf.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass eine Überexpression von NL3-R451C zu einer Resistenz der Synapsen gegenüber Latrunculin A führt, die Synapsendichte gegenüber der Kontrollgruppe aber nicht erhöht wird. Zudem wurden die in Abschnitt 3.1 gezeigten Effekte durch Überexpression von NL3 erneut bestätigt.

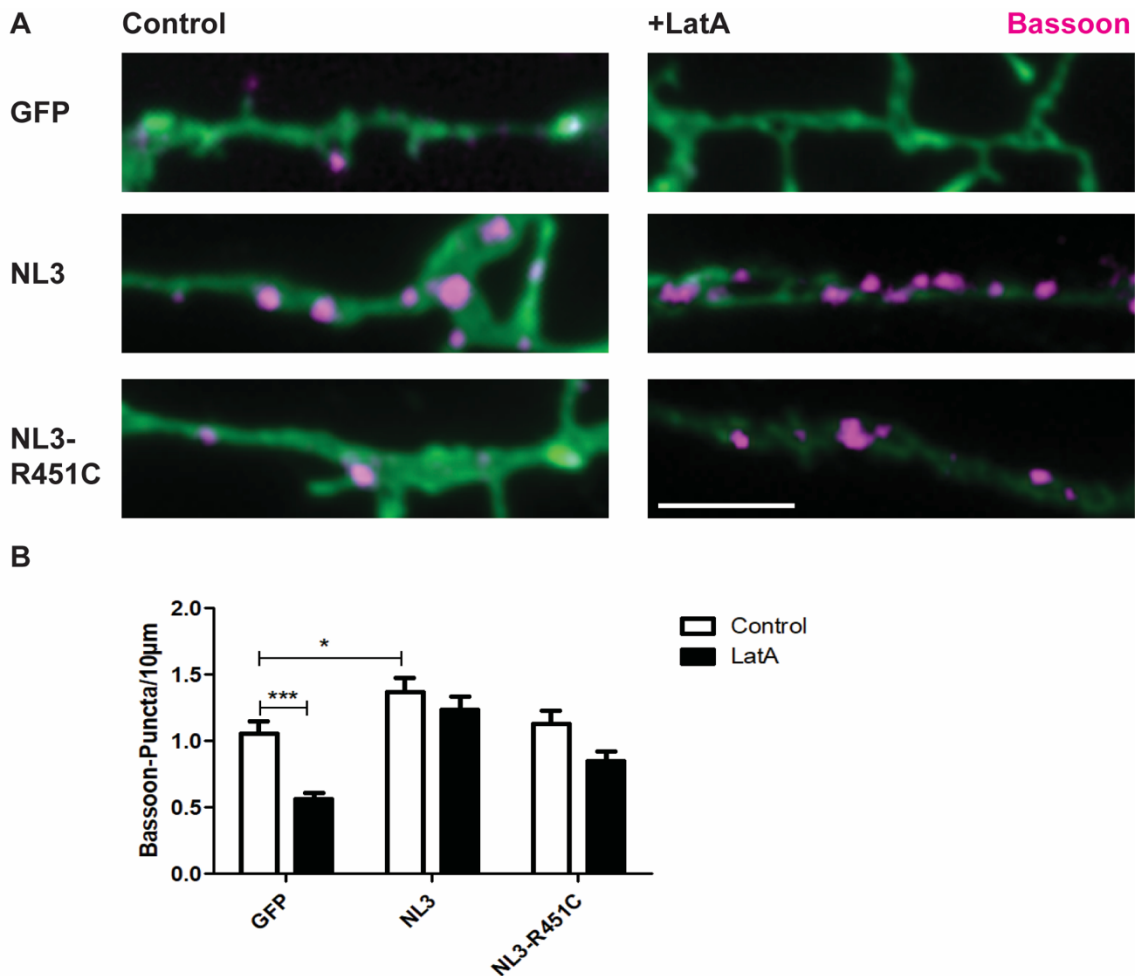


Abbildung 2: Latrunculin A Assay nach Expression von rekombinantem NL3 und NL3-R451C (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und HA-NL3-R451C transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, rechts Ausschnitte aus den Zellpopulationen, die mit Latrunculin A (LatA) behandelt wurden. Die magentafarbene Färbung zeigt Bassoon, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Für GFP-F lässt sich ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,001$) zwischen der Kontrollgruppe und Latrunculin A-Behandlung ausmachen. Die Kontrollgruppen der NL3-Zellen weisen einen signifikanten Unterschied (* $p < 0,05$) gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe auf. Die NL3-R451C-Kontrollgruppe zeigt keine signifikante Erhöhung der Synapsendichte gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe. Innerhalb der NL3- und NL3-R451C-Kontrollgruppen und Latrunculin A-Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.3 Synaptotagmin-1 Antikörper-Uptake

Neben der strukturellen und morphologischen Entwicklung der Neurone durch Überexpression von NL3 und NL3-R451C, wurde zudem die funktionelle Reifung untersucht. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt, welches zeigen sollte, ob die Überexpression der Proteine das Ausmaß des Recyclings synaptischer Vesikel steigert. An DIV 5 wurde zu Zellkulturen, die an DIV 3 mit NL3, NL3-R451C und als Kontrollgruppe mit GFP-F transfiziert wurden, ein Antikörper gegen die intravesikuläre (luminale) Domäne des vesikelassozierten Proteins Synaptotagmin-1 in einem Stimulationspuffer gegeben. Der Antikörper bindet nach der stimulierten Exozytose an das auf der Plasmamembran exponierte Synaptotagmin-1 und wird mit diesem während der anschließenden Endozytose aufgenommen. Die intrazelluläre Menge an aufgenommenen Synaptotagmin-1 Antikörpern ist also proportional zur Anzahl der am stimulierten Exo-Endozytose-Zyklus teilnehmenden Vesikel. Sie kann nach Fixieren und Immunfärbung mit einem sekundären Antikörper als Fluoreszenzintensität bestimmt werden.

Die durchschnittliche Intensität der Fluoreszenzsignale lag für die GFP-F-Kontrollgruppe bei $221,12 \pm 12,22$. Die NL3 überexprimierenden Zellen wiesen demgegenüber eine Steigerung der relativen Intensität auf $317,44 \pm 29,20$ auf. Der Unterschied zwischen der GFP-F- und NL3-Gruppen ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Bei Überexpression von NL3-R451C lag die relative Intensität im Mittel bei $258,14 \pm 14,20$. Zwischen den GFP-F- und NL3-R451C-Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

Aus diesem Experiment lässt sich schlussfolgern, dass eine Überexpression von NL3 in jungen Neuronen zu einer funktionellen Reifung im Sinne eines gesteigerten Vesikelrecycling führt. Überexprimiert man allerdings NL3-R451C, kann dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die mutierte Variante des NL3 ist also nicht im Stande eine funktionelle Reifung der Zellen zu induzieren.

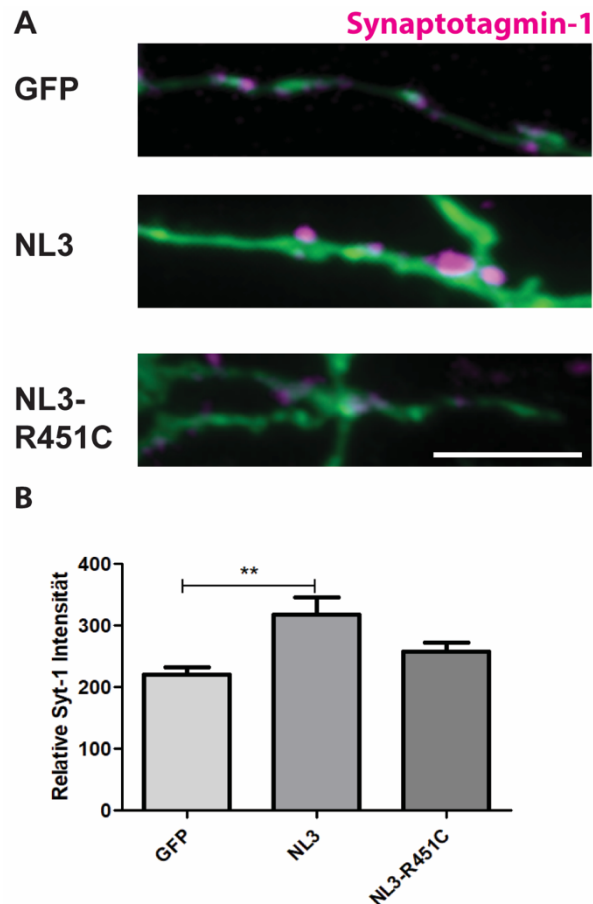


Abbildung 3: Synaptotagmin-1 Assay nach Expression von NL3 und NL3-R451C (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und HA-NL3-R451C transfizierten Zellen an DIV 5. Die magentafarbene Färbung zeigt Synaptotagmin-1, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Die relative Fluoreszenzintensität des Synaptotagmin-1 ist bei der NL3-Gruppe im Vergleich zur GFP-F-Kontrollgruppe signifikant (** $p < 0,01$) erhöht. Zwischen der NL3-R451C-Gruppe und der GFP-F-Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.4 Marker für synaptische Vesikel

Die Ergebnisse der Experimente aus Abschnitt 3.1 und 3.2 zeigen die Synapsenzahl und Resistenz gegenüber Latrunculin A für ein präsynaptisches Gerüstprotein (Bassoon). Als weitere Fragestellung ergab sich, wie sich andere präsynaptische Proteine bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C und unter Zugabe von Latrunculin A verhalten. Hierzu wurden Zellen an DIV 5 analog zur Beschreibung in Abschnitt 3.1 für sechs Stunden mit Latrunculin A behandelt und anschließend fixiert. Im Zuge der Immunfärbung wurden allerdings anstelle von Bassoon Antikörper gegen das vesikelassoziierte Protein Synaptophysin und gegen Synapsin-1 und -2 verwendet.

Darüber hinaus wurden Kollokalisierungsuntersuchungen mit den Vesikelmarkern VGAT und VGlut1 durchgeführt. VGAT diente hier zur Markierung inhibitorischer Synapsen, während VGlut1 exzitatorische Synapsen markieren sollte.

3.4.1 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein integrales Transmembranprotein synaptischer Vesikel. Da Synaptophysin im Gehirn als ubiquitär exprimiert gilt, kann es als universeller Vesikelmarker verwendet werden (Fykse et al. 1993). Anhand dieses Experiments sollte mittels Synaptophysin als Marker untersucht werden, ob durch eine Überexpression von NL3 und NL3-R451C die Anzahl synaptischer Vesikel gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe verändert wird und ob sich nach Zugabe von Latrunculin A die Anzahl der Vesikel ändert.

Betrachtet man die GFP-F-Kontrollgruppe lässt sich feststellen, dass im unbehandelten Zustand eine durchschnittliche Anzahl von $0,9 \pm 0,11$ Synaptophysinsignale pro $10 \mu\text{m}$ vorliegen. Eine Zugabe von Latrunculin A führt zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,01$) dieser Dichte auf $0,44 \pm 0,05$ pro $10 \mu\text{m}$. Im Kontrollzustand lässt sich also feststellen, dass nach Zugabe von Latrunculin A eine Reduktion der Anzahl von Synaptophysinsignalen respektive synaptischer Vesikel zu verzeichnen ist.

Bei Überexpression von NL3 zeigt sich im Mittel $1,21 \pm 0,13$ Synaptophysinsignale pro $10 \mu\text{m}$. Gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe zeigt sich hier kein signifikanter Unterschied. Bei Applikation von Latrunculin A zu den NL3 transfizierten Zellen wird die Dichte auf $0,76 \pm 0,07$ pro $10 \mu\text{m}$ reduziert. Der Unterschied zwischen der NL3-Kontrollgruppe und der NL3-Latrunculin A-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Überexprimiert man NL3-R451C lassen sich durchschnittlich $0,7 \pm 0,11$ Synaptophysinsignale pro $10 \mu\text{m}$ feststellen. Auch hier besteht kein signifikanter Unterschied gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe. Durch Zugabe von Latrunculin A kann eine Anzahl von $0,53 \pm 0,08$ Synaptophysinsignalen pro $10 \mu\text{m}$ verzeichnet werden. Innerhalb der beiden NL3-R451C-Konditionen besteht kein signifikanter Unterschied.

Anhand dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass unter Kontrollbedingungen keine Resistenz synaptischer Vesikel gegenüber Latrunculin A besteht. Zudem zeigt sich, dass bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C die Dichte synaptischer Vesikel nicht erhöht wird. Nach Zugabe von Latrunculin A wird die Dichte synaptischer Vesikel bei NL3-Überexpression reduziert, bei NL3-R451C-Überexpression hingegen nicht. Nur die punktmutierte Variante von NL3, nicht aber wildtyp NL3, kann also synaptische Vesikelanordnungen so stabilisieren, dass sie unabhängig vom F-Aktin-Zytoskelett an Synapsen verankert werden.

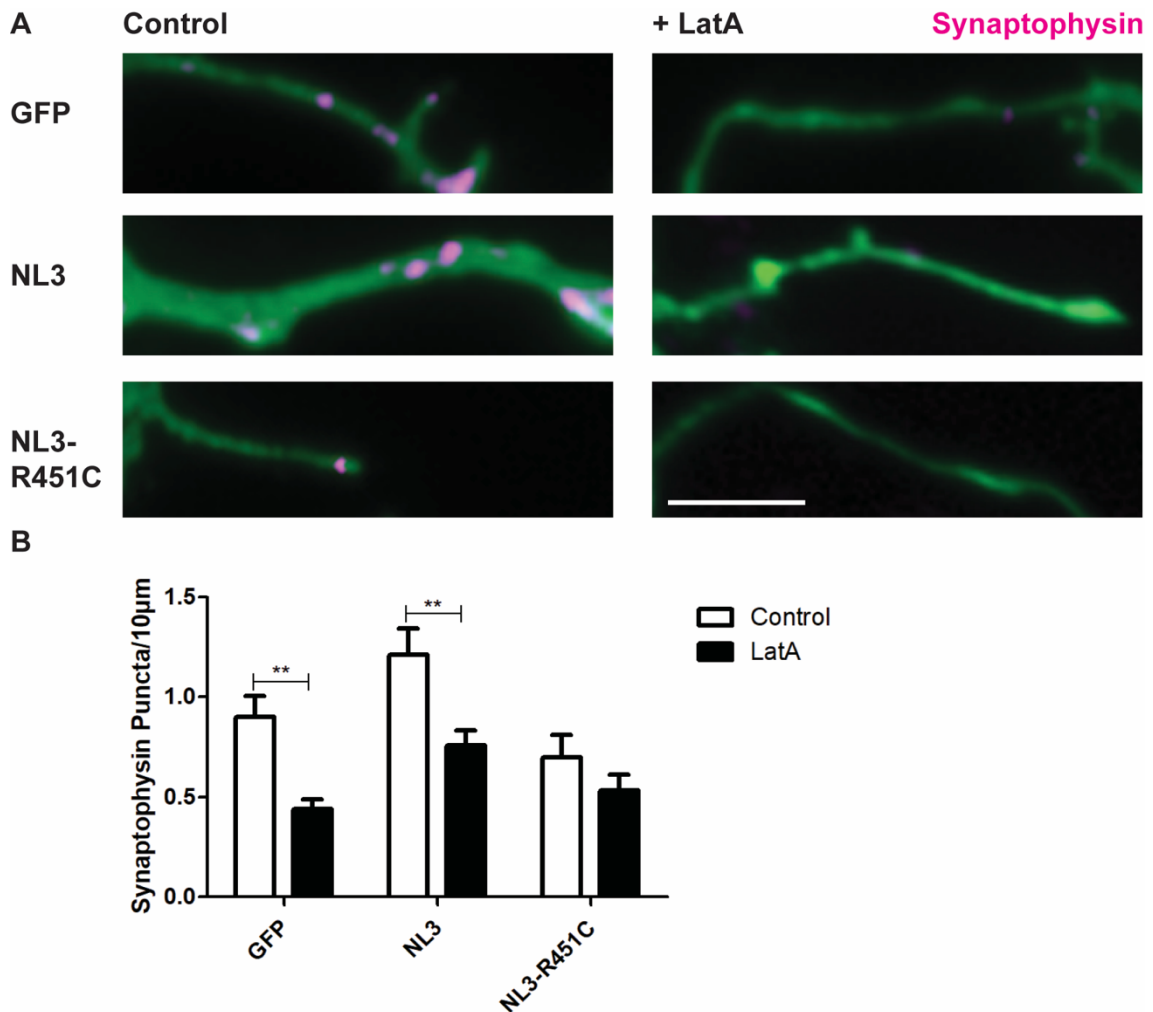


Abbildung 4: Synaptophysin als Marker im Latrunculin A Assay nach Expression NL3 und NL3-R451C (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und HA-NL3-R451C transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, rechts Ausschnitte aus den Zellpopulationen, die mit Latrunculin A (LatA) behandelt wurden. Die magentafarbene Färbung zeigt Synaptophysin, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Für GFP-F lässt sich ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) zwischen der Kontrollgruppe und Latrunculin A-Behandlung ausmachen. Innerhalb der beiden NL3-Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$). In den NL3-R451C-Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weder die NL3-, noch die NL3-R451C-Kontrollgruppe weist einen signifikanten Unterschied gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe auf. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.4.2 Synapsin

Als weiterer Marker im Latrunculin A Assay der synaptischen Vesikel wurde ein Antikörper gegen Synapsin-1 und -2 verwendet. Die Synapsine sind eine Proteinfamilie mit drei Isoformen, die an Präsynapsen vorkommen. Man vermutet, dass die Synapsine als eine Art Vermittler zwischen synaptischen Vesikeln und dem Cytoskelett fungieren und zentrale Rollen in der präsynaptischen Organisation und funktioneller Regulation synaptischer Vesikel übernehmen (Chi et al. 2003).

Auch in diesem Experiment wurden Zellen mit GFP-F, NL3 und NL3-R451C transfiziert und mit Latrunculin A behandelt.

In der GFP-F-Kontrollgruppe zeigt sich eine durchschnittliche Anzahl von Synapsinsignalen von $1,2 \pm 0,18$ pro $10 \mu\text{m}$. Bei Zugabe von Latrunculin A ergibt sich eine Dichte von $0,64 \pm 0,09$ Synapsinsignalen auf $10 \mu\text{m}$. Statistisch ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant.

In NL3 überexprimierenden Zellen lässt sich eine Anzahl von $2,06 \pm 0,21$ Synapsinsignalen pro $10 \mu\text{m}$ ausmachen. Gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe besteht hier ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). Bei Zugabe von Latrunculin A zu den mit NL3 transfizierten Zellen finden sich $1,43 \pm 0,18$ Synapsinsignale pro $10 \mu\text{m}$. Der Unterschied zwischen der NL3-Kontrollgruppe und nach Latrunculin A Zugabe ist statistisch nicht signifikant.

Bei Überexpression von NL3-R451C beträgt die mittlere Anzahl der Synapsinsignale $0,75 \pm 0,19$ pro $10 \mu\text{m}$. Behandelt man NL3-R451C überexprimierende Zellen mit Latrunculin A, lässt sich eine Anzahl von $0,91 \pm 0,23$ Synapsinsignalen pro $10 \mu\text{m}$ ausmachen. Der Unterschied zwischen den beiden NL3-R451C-Gruppen ist statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieses Experimentes, dass die Überexpression von NL3 die Anzahl an Synapsinsignalen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, während dieser Effekt bei NL3-R451C-Überexpression ausbleibt. Zudem führt die Applikation von Latrunculin A nicht zu einer signifikanten Veränderung der Synapsinsignale.

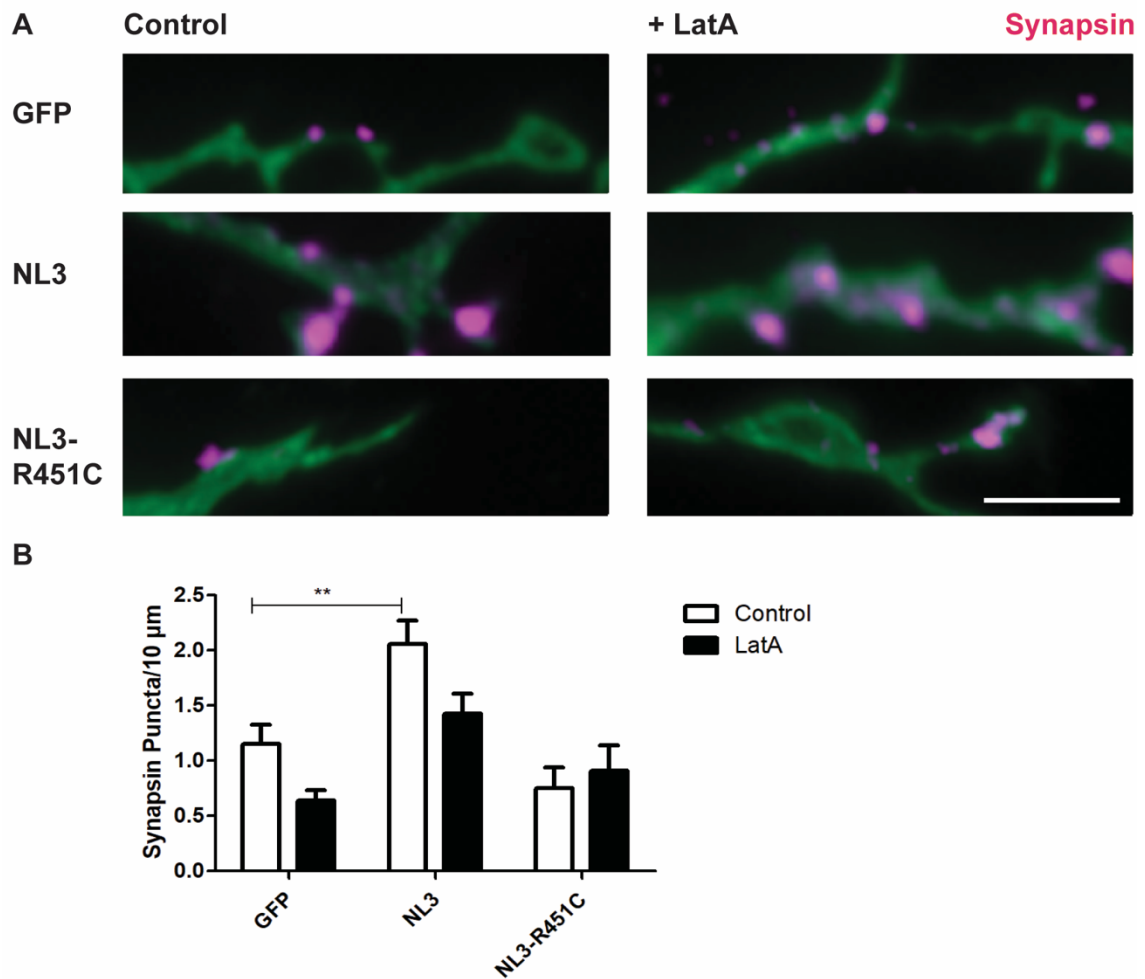


Abbildung 5: Synapsin-1 und -2 als Marker im Latrunculin A Assay nach Expression von NL3 und NL3-R451C (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und HA-NL3-R451C transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, rechts Ausschnitte aus den Zellpopulationen, die mit Latrunculin A (LatA) behandelt wurden. Magenta zeigt Synapsin-1 und -2, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Innerhalb aller drei Gruppen (GFP-F, NL3, NL3-R451C) lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und nach Latrunculin A Zugabe feststellen. Zwischen der NL3-Kontrollgruppe und der GFP-F-Kontrollgruppe besteht ein signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$). Die NL3-R451C-Kontrollgruppe und die GFP-F-Kontrollgruppe weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.4.3 VGAT und VGlut1

Abschließend wurden in der Experimentengruppe der synaptischen Vesikelmarker die Proteine VGAT und VGlut1 untersucht. Diese Proteine sind spezifisch für einzelne Synapsentypen. So lässt sich VGAT nur an inhibitorischen, VGlut1 ausschließlich an exzitatorischen Synapsen ausmachen. Beide Proteine kommen auf synaptischen Vesikeln des jeweiligen Synapsentyps vor und fungieren als Transporter für Neurotransmitter. VGAT transportiert GABA, während VGlut1 Glutamat transportiert.

Im Zuge dieses Experimentes sollte untersucht werden, ob bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C eine vermehrte Anzahl von VGAT- oder VGlut1-Signalen im Vergleich zur GFP-F-Kontrollgruppe vorliegt.

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen ließ sich an DIV 5 in den analysierten Kulturen allerdings keine punktuelle Anreicherung von VGAT oder VGlut1 ausmachen. Die Fluoreszenzsignale beider Färbungen waren schwach und homogen entlang der Dendriten verteilt und ohne Anzeichen der lokalen Anreicherung. Dementsprechend war eine quantitative Analyse nicht möglich. Als Kontrolle wurde eine Doppelfärbung von VGAT und VGlut1 in unbehandelten reifen Kulturen an DIV 14 durchgeführt. Hier zeigte sich im Vergleich eine punktuelle Anreicherung beider Marker. Zudem wiesen die Signale keine Kolokalisation auf, was den Schluss zulässt, dass sie in reifen Kulturen in den jeweils spezifischen Synapsentypen angereichert sind.

Aus den Ergebnissen dieses Experiments lässt sich ableiten, dass in jungen Kulturen an DIV 5 keine der Analyse zugängliche, punktuelle Anreicherung von VGAT und VGlut1 vorhanden ist. Zwischen den drei Zellgruppen zeigten sich keine Unterschiede.

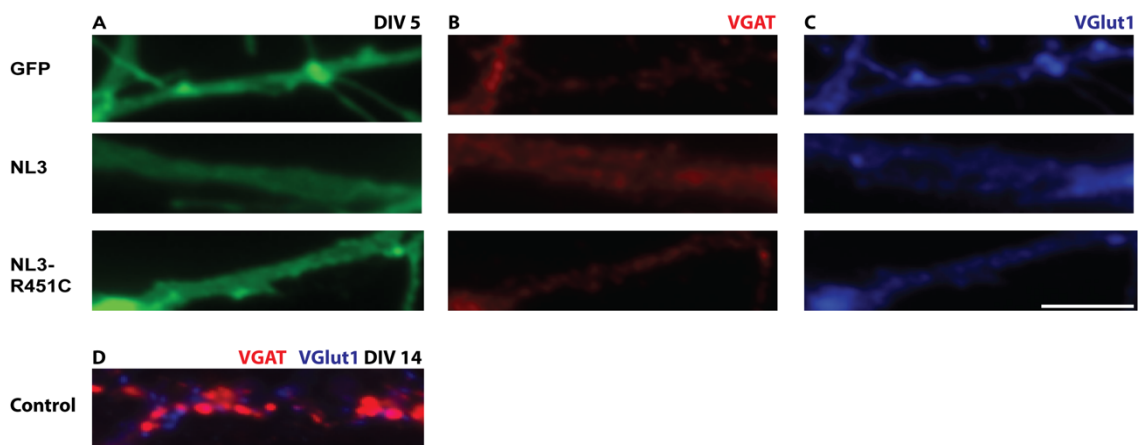


Abbildung 6: VGAT und VGlut1 (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und HA-NL3-R451C transfizierten Zellen an DIV 5. In grün sind die jeweiligen Plasmidtags (HA-Tag, GFP-F) dargestellt. (B) zeigt in rot die VGAT-Färbung für GFP-F, NL3 und NL3-R451C. Der Ausschnitt der Dendriten entspricht dabei jeweils der in (A) gezeigten Stellen. Es lässt sich keine klar punktierte Anreicherung von VGAT ausmachen. (C) zeigt in blau die VGlut1-Färbung für GFP-F, NL3 und NL3-R451C. Auch hier ist keine klar punktierte Anreicherung von VGlut1 erkennbar. Der Ausschnitt des Dendriten entspricht dabei

ebenfalls der in (A) gezeigten Stelle. (D) zeigt eine Doppelfärbung von VGAT in rot und VGlut1 in blau in unbehandelten Zellen an DIV 14 zur Kontrolle. Hier zeigt sich eine im Vergleich deutlich punktierte Anreicherung beider Proteine bei ausbleibender Kolo-kalisation. Der Maßstab entspricht 10 μm .

3.5 Sholl-Analyse

Die durch Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Bilder der Zellen wiesen morphologische Diskrepanzen zwischen den Gruppen GFP-F, NL3 und NL3-R451C auf. Um das Ausmaß dieser Unterschiede zu quantifizieren, wurden Bilder von unbehandelten Zellen aller drei Gruppen mittels der Sholl-Analyse ausgewertet. Die Sholl-Analyse ist ein Verfahren, das Auskunft über die Verzweigungsintensität des Dendritenbaums von Neuronen gibt. In dieser Analyse wurden Kreise mit Radien zwischen 11 und 50 μm mit einem Abstand von 1 μm um den jeweiligen Mittelpunkt konstruiert. Anhand dessen lässt sich erkennen, wie sich das Verzweigungsausmaß der Dendriten über eine zunehmende Strecke in die distalen Dendritenbereiche verhält.

Vergleicht man die NL3 transfizierten Zellen mit den GFP-F-Kontrollzellen, zeigt sich ein erhöhtes Ausmaß der Verzweigung sowohl im eher proximalen, als auch im distal gelegenen Bereich des Dendritenbaums.

Im Vergleich dazu führt eine Überexpression von NL3-R451C in Zellkulturen gegenüber der GFP-F-Kontrollgruppe zu einer erhöhten Verzweigungsintensität im proximalen Bereich. Im distalen Bereich lassen sich keine Unterschiede ausmachen.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den NL3-Zellen und den NL3-R451C-Zellen bestätigt sich die vorherige Beobachtung. Während im proximalen Bereich eine ähnliche Verzweigungsintensität erkennbar ist, wird der Verzweigungsgrad im distalen Bereich bei NL3-Überexpression gegenüber NL3-R451C gesteigert. Die Daten der statistischen Analyse sind in Tabelle 7 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Daten festhalten, dass NL3-Überexpression zu einer Erhöhung des Verzweigungsgrads im proximalen und distalen Dendritenbereich führt, während bei NL3-R451C-Überexpression nur ein Effekt im proximalen Bereich zu beobachten ist.

Tabelle 7: Statistische Auswertung der Sholl-Analyse

Radius [µm]	p-Wert: GFP-F - NL3	p-Wert: GFP-F - NL3-R451C	p-Wert: NL3 - NL3-R451C	Radius [µm]	p-Wert: GFP-F - NL3	p-Wert: GFP-F - NL3-R451C	p-Wert: NL3 - NL3-R451C
11	0,7625	0,5551	0,5059	31	0,0010 **	0,0447 *	0,1228
12	0,2049	0,7144	0,3187	32	0,0205 *	0,3183	0,1744
13	0,4456	0,978	0,2188	33	0,0029 **	0,2085	0,0495 *
14	0,2366	0,8775	0,1577	34	0,0039 **	0,2753	0,0995
15	0,1148	0,8571	0,0726	35	0,0005 ***	0,127	0,0250 *
16	0,1656	0,6778	0,2547	36	0,0055 **	0,4298	0,0316 *
17	0,1817	0,4725	0,4654	37	0,0020 **	0,7523	0,0068 **
18	0,0161 *	0,0286 *	0,456	38	0,0892	0,5775	0,0410 *
19	0,0758	0,0628	0,7968	39	0,0134 *	0,6072	0,0051 **
20	0,1712	0,0502	0,7333	40	0,0439 *	0,2806	0,0068 **
21	0,0120 *	0,0053 **	0,744	41	0,0078 **	0,4746	0,0014 **
22	0,0199 *	0,0053 **	0,9546	42	0,0211 *	0,434	0,0037 **
23	0,0213 *	0,0033 **	0,8057	43	0,0116 *	0,3358	0,0014 **
24	0,0247 *	0,0137 *	0,6292	44	0,0013 **	0,3466	0,0004 ***
25	0,0211 *	0,0106 *	0,9659	45	0,0211 *	0,1512	0,0006 ***
26	0,0168 *	0,0053 **	0,7055	46	0,0071 **	0,7024	0,0033 **
27	0,0011 **	0,0038 **	0,5439	47	0,0033 **	0,3029	0,0004 ***
28	0,0078 **	0,0147 *	0,2212	48	0,0124 *	0,1653	0,0002 ***
29	0,0002 ***	0,0137 *	0,7702	49	0,0152 *	0,4218	0,0023 **
30	0,0104*	0,0468 *	0,9455	50	0,2355	0,1287	0,0118 *

Die Tabelle zeigt die Radien der konstruierten Kreise in aufsteigender Reihenfolge. In den Zellen sind die jeweiligen p-Werte der verglichenen Datensätze (GFP-F-, HA-NL3- und HA-NL3-R451C-Zellkulturen) je Radius aufgeführt. Die Bestimmung der p-Werte erfolgte bei Normalverteilung der Daten mittels ungepaartem t-Test, bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Test. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

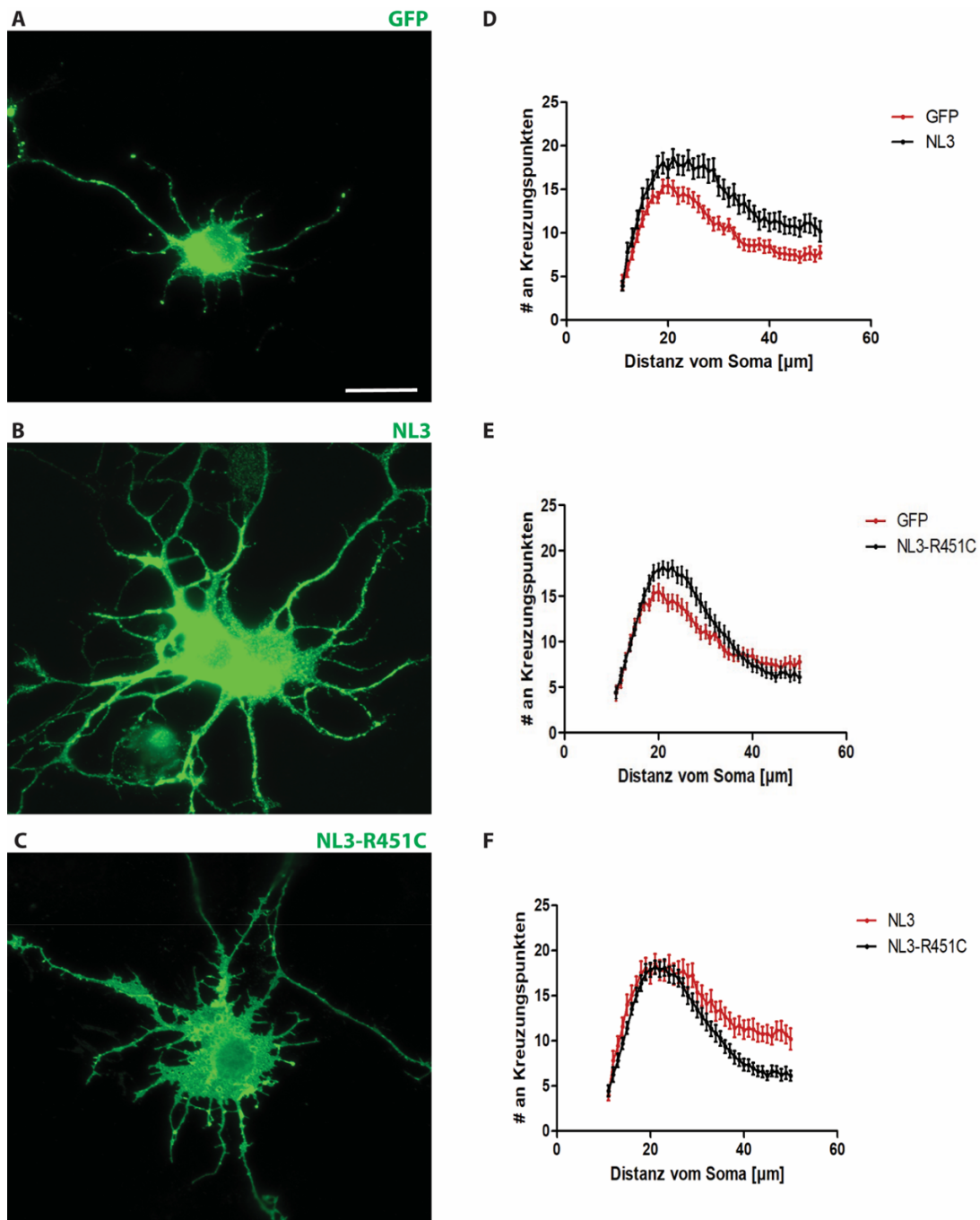


Abbildung 7: Sholl-Analyse (A) zeigt eine repräsentative Zelle der GFP-F-Gruppe, (B) zeigt eine repräsentative Zelle der HA-NL3-Gruppe, (C) zeigt eine repräsentative Zelle der HA-NL3-R451-Gruppe. Die grüne Färbung in (A), (B) und (C) zeigt das jeweilige Plasmidtag (GFP-F, HA-Tag). (D) zeigt die quantitativen Ergebnisse der Sholl-Analyse für GFP-F (rot) und NL3 (schwarz). Es zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Kreuzungspunkte in der NL3-Gruppe im proximalen und distalen Bereich. (E) zeigt die quantitativen Ergebnisse der Sholl-Analyse für GFP-F (rot) und NL3-R451C (schwarz). Es zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Kreuzungspunkte in der NL3-R451C-Gruppe im proximalen Bereich. (F) zeigt die quantitativen Ergebnisse der Sholl-Analyse für NL3 (rot) und NL3-R451C (schwarz). Es zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Kreuzungspunkten in der NL3-Gruppe im distalen Bereich. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler je Radius. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30-33$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $30 \mu\text{m}$.

3.6 TrkB-Fc Assay

Nachdem in den vorigen Experimenten unterschiedliche strukturelle und funktionelle Effekte auf junge Zellkulturen durch Überexpression von NL3 und NL3-R451C festgestellt werden konnten, sollte abschließend untersucht werden, inwiefern die erzielten Effekte vom Vorhandensein von BDNF abhängen. Durch vorangegangene Studien ist bereits bekannt, dass die durch Überexpression der Neuroliginisoformen NL1 und NL2 erzielten Effekte von BDNF abhängen. Entfernt man sezerniertes BDNF aus den Zellkulturen, so können die Effekte nicht mehr suffizient vermittelt werden (Petkova et al. 2018).

In diesem Experiment sollte daher getestet werden, ob bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C bei Inhibition des BDNF-Signals die strukturellen Effekte im Sinne der Beeinflussung der Synapsenzahl und bestehen bleiben oder nicht.

Hierzu wurden Zellkulturen mit NL3, NL3-R451C und zur Kontrolle mit GFP-F an DIV 3 analog zum Vorgehen in den anderen Experimenten transfiziert. An DIV 4 wurde eine lösliche, rekombinante humane Form des BDNF-Rezeptors TrkB hinzugegeben. Als präsynaptischer Marker wurde Bassoon verwendet.

In der GFP-F-Kontrollgruppe zeigte sich bei Zugabe von TrkB-Fc eine Reduktion der Synapsenzahl der Kontrollgruppe von $1,67 \pm 0,07$ pro $10 \mu\text{m}$ auf $1,05 \pm 0,09$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Überexprimierte man NL3 in Zellkulturen konnte man in der Kontrollgruppe eine mittlere Synapsenzahl von $2,35 \pm 0,1$ pro $10 \mu\text{m}$ ausmachen. Bei Zugabe von TrkB-Fc reduzierte sich diese auf $1,31 \pm 0,07$ pro $10 \mu\text{m}$. Auch hier ließ sich statistisch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) nachweisen.

Auch die Überexpression von NL3-R451C zeigte ähnliche Daten. Während in der Kontrollgruppe $1,59 \pm 0,09$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ auszumachen waren, zeigten die Zellen bei Zugabe von TrkB-Fc durchschnittlich $1,04 \pm 0,07$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Aus den Ergebnissen dieses Experiments lässt sich ableiten, dass eine Zugabe von TrkB-Fc und damit Inhibition des BDNF-Signals zu einer signifikanten Reduktion der Synapsenzahl sowohl in der Kontrollgruppe, als auch bei Überexpression von NL3 und NL3-R451C führt. Die Stabilität gebildeter Synapsen scheint also auch trotz vermehrter Produktion von NL3 und NL3-R451C von BDNF abzuhängen.

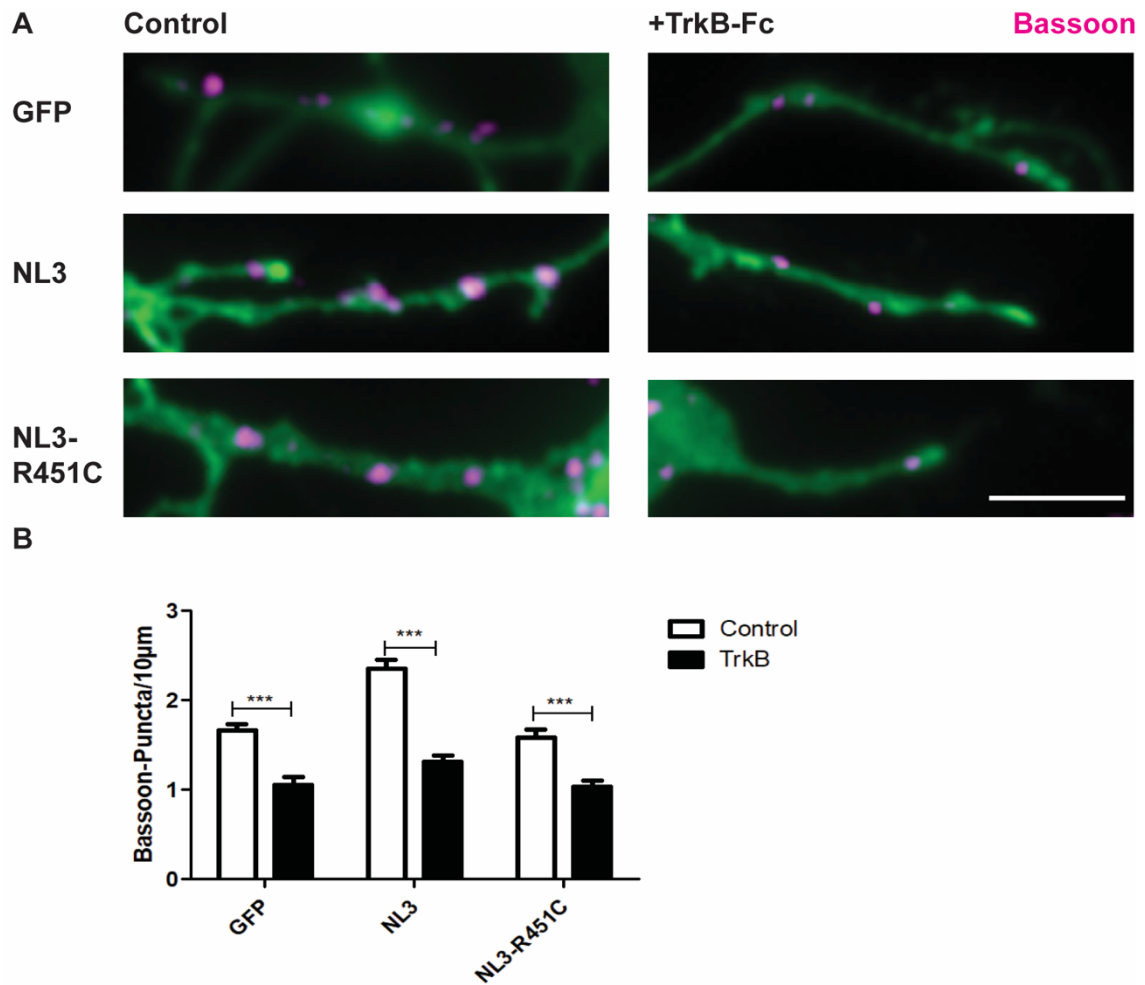


Abbildung 8: Effekte von Neuroliginen auf die Anzahl von Synapsen bei Blockade der BDNF-Funktion (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und NL4-Venus transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, rechts Ausschnitte aus den Zellpopulationen, die mit TrkB-Fc behandelt wurden, um die Funktion von endogenem BDNF zu blockieren. Die magentafarbene Färbung zeigt Bassoon, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag, Venus) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Für alle drei Plasmide lässt sich ein signifikanter Unterschied (***) ($p < 0,001$) zwischen den Kontrollgruppen und den TrkB-Fc-Gruppen ausmachen. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.7 TrkB-Fc Assay unter Zugabe von Latrunculin A

Im Experiment aus Abschnitt 3.6 konnte gezeigt werden, dass die Effekte von NL3 und NL3-R451C auf die Synapsenzahl vom Vorhandensein von BDNF in den Zellkulturen abhängt. Aus dem Experiment in Abschnitt 3.2 ging neben der Beeinflussung der Synapsenzahl auch die Bildung einer Resistenz der Synapsen gegen Zugabe von Latrunculin A bei Überexpression beider Plasmide hervor. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt ebenfalls von dem Vorhandensein von BDNF abhängt, wurde das TrkB-Fc Assay mit dem Latrunculin A Assay kombiniert. Den Zellen wurde nach Transfektion an DIV 3, TrkB-Fc an DIV 4 hinzugefügt, um das sezernierte BDNF zu binden. An DIV 5 wurde sechs Stunden vor dem Fixieren zusätzlich Latrunculin A hinzugefügt um das Aktinskelett zu depolymerisieren. Die Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt.

In der GFP-F-Kontrollgruppe zeigt sich bei Zugabe von TrkB-Fc mit einer Synapsenzahl von $1,01 \pm 0,07$ pro $10 \mu\text{m}$ ein vergleichbarer Effekt zu dem Ergebnis aus Abschnitt 3.6. Die Zugabe von Latrunculin A führte hier zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Synapsenzahl ($p < 0,01$) auf $0,66 \pm 0,04$ pro $10 \mu\text{m}$.

Die NL3-Kontrollgruppe zeigte nach TrkB-Fc Applikation eine durchschnittliche Synapsenzahl von $1,43 \pm 0,09$ pro $10 \mu\text{m}$. Auch hier führte die Zugabe von Latrunculin A zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,001$) auf $0,96 \pm 0,06$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$.

Bei Überexpression von NL3-R451C zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis. Die Kontrollgruppe wies eine Synapsenzahl von $1,07 \pm 0,09$ pro $10 \mu\text{m}$ auf. Durch Behandlung der Zellen mit Latrunculin A wurden im Mittel $0,75 \pm 0,06$ Synapsen pro $10 \mu\text{m}$ ermittelt. Applikation von Latrunculin A reduzierte auch hier die Synapsenzahl signifikant ($p < 0,01$).

Anhand der Daten dieses Experiments zeigt sich, dass NL3 und NL3-R451C bei Blockade der BDNF-Funktion nur eingeschränkte Effekte auf die Reifung von Synapsen ausüben können.

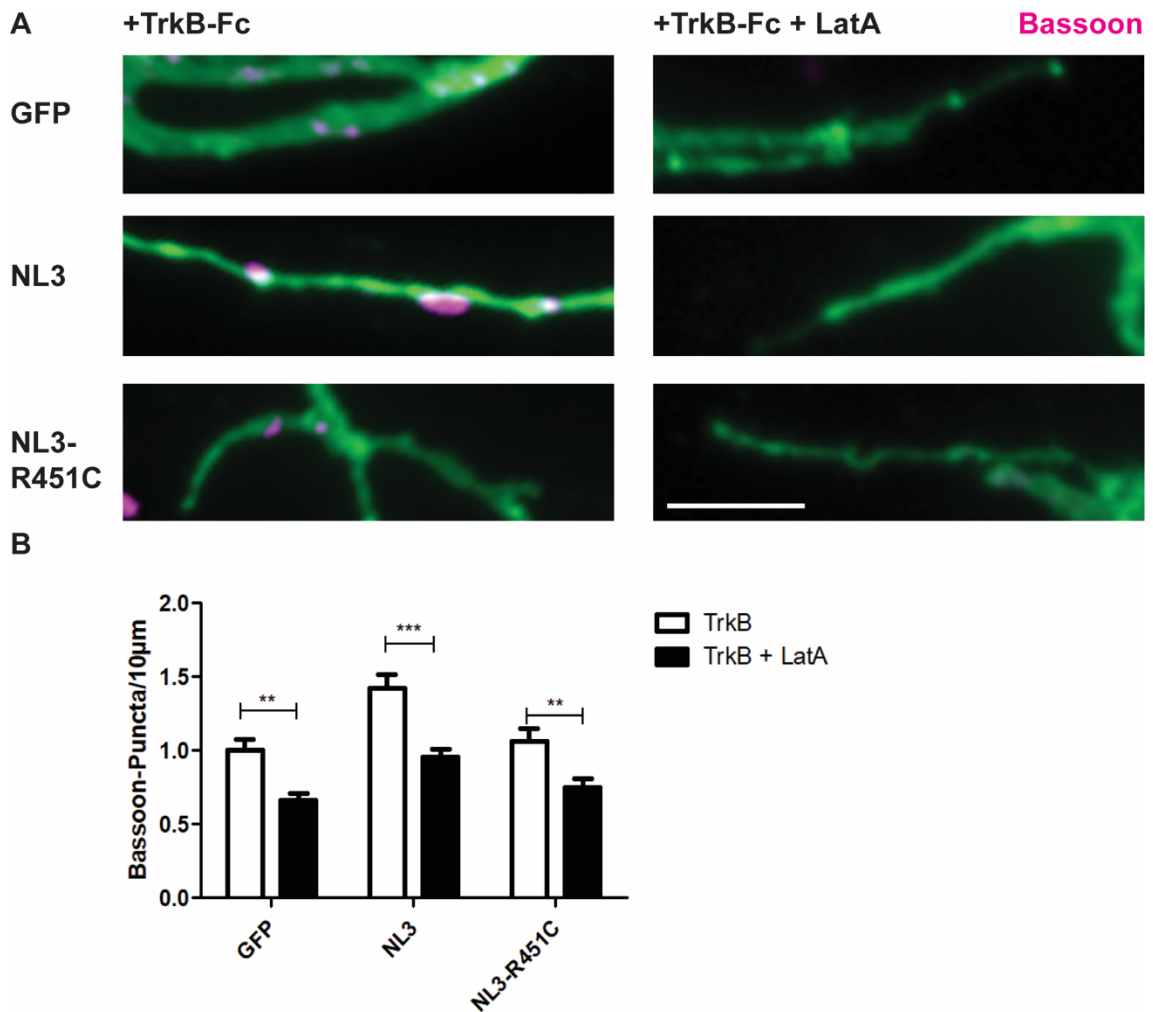


Abbildung 9: Effekte von Neuroliginen auf die strukturelle Reifung von Synapsen bei Blockade der BDNF-Funktion (A) zeigt Dendritenausschnitte der mit GFP-F, HA-NL3 und NL4-Venus transfizierten Zellen an DIV 5. Links sind Ausschnitte der Kontrollgruppen gezeigt, die mit TrkB-Fc behandelt wurden. Rechts sind Ausschnitte aus den Zellpopulationen dargestellt, die mit TrkB-Fc und Latrunculin A (LatA) behandelt wurden. Die magentafarbene Färbung zeigt Bassoon, in grün sind die jeweiligen Plasmid-Tags (GFP-F, HA-Tag, Venus) dargestellt. (B) zeigt die quantitative Darstellung der Datenanalyse. Für GFP-F (** $p < 0,01$), NL3 (***) ($p < 0,001$) und NL3-R451C (** $p < 0,01$) lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den TrkB-Fc-Gruppen und den TrkB-Fc+LatA-Gruppen ausmachen. Die aufgeführten Werte zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler. Die analysierte Datenmenge lag bei $n = 30$ Zellen je Gruppe aus drei Experimenten. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$.

3.8 Übersicht der Ergebnisse

Aus den im Vorfeld beschriebenen Experimenten lassen sich eine Vielzahl von Effekten durch Überexpression von NL3, NL4 und NL3-R451C feststellen. Es konnten neben der Beeinflussung der Anzahl und Stabilität der Synapsen sowie einer funktioneller Reifung der Neurone auch Einflüsse auf synaptische Vesikel und die morphologische Entwicklung der Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit der strukturellen Reifung vom Vorhandensein von BDNF nachgewiesen.

Im Folgenden soll eine tabellarische Übersicht die Ergebnisse dieser Assays zusammenfassend darstellen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse

Aspekt	NL3	NL3-R451C	NL4
Synapsenzahl	↑	-	↑
LatA-Resistenz von Bassoon	+	+	+
Synaptotagmin-1 Antikörper-Uptake	↑	-	n.u.
LatA-Resistenz von Synaptophysin	-	+	n.u.
LatA-Resistenz von Synapsin-1/-2	+	+	n.u.
Dendritenverzweigung	↑ (proximal und distal)	↑ (nur proximal)	n.u.
Abhängigkeit von BDNF	+	+	n.u.

↑: erhöht +: zutreffend -: unverändert/nicht vorhanden n.u.: nicht untersucht.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein *Gain-of-function*-Ansatz benutzt, um die Funktionen und die Funktionsweise postsynaptischer Zelladhäsionsproteine der Neuroligin-Familie auf die Bildung und Reifung präsynaptischer Nervenendigungen zu untersuchen. Die Hauptergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig, dass i) NL3 und NL4 die strukturelle Reifung präsynaptischer aktiver Zonen induzieren; und ii) dass NL3 für die Vermittlung dieses transsynaptischen Effekts auf die Anwesenheit des Neurotrophins BDNF angewiesen ist. Darüber hinaus wurden die Effekte von NL3 und einer mit Autismus assoziierten punktmutierten Variante von NL3 vergleichend und umfangreich charakterisiert. Dabei ergab sich ein komplexes Bild aus ähnlichen und unterschiedlichen Effekten dieser beiden Moleküle auf die Anzahl von Synapsen, die Stabilisierung aktiver Zonen, die Stabilisierung synaptischer Vesikelansammlungen, das Recycling synaptischer Vesikel und die Verzweigung von Dendriten.

4.1 Einfluss der Neuroligine auf die strukturelle Reifung aktiver Zonen

Nachdem der Einfluss der Neuroliginisoforamen NL1 und NL2 auf die Reifung von Synapsen bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Wittenmayer et al. 2009; Petkova et al. 2018), stellte sich die Frage inwieweit ähnliche Mechanismen für NL3, NL4 und die mutierte NL3-Variante NL3-R451C gelten. Durch Überexpression dieser Proteine in jungen hippocampalen Neuronen von Rattenembryonen, konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass NL3 und NL4 eine strukturelle Reifung von Synapsen im Sinne einer Unabhängigkeit vom zellulären Aktinzytoskelett induzieren.

Die NL3-Mutante konnte zwar ebenfalls die Synapsenreifung hervorrufen, lies allerdings die Synapsenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

Ableitend aus den Ergebnissen stellen sich bezüglich der Synapsenreifung drei übergeordnete Fragen:

- 1) Welche Signalwege und Mechanismen kommen auf zellulärer und molekularer Ebene als Erklärung für die beobachteten Effekte in Frage?
- 2) Werden die Synapsenreifung und die Erhöhung der Synapsenzahl auf unterschiedlichen Wegen vermittelt?
- 3) Wie erklärt sich die eingeschränkte Funktion von NL3-R451C?

Molekulare Mechanismen der strukturellen Reifung aktiver Zonen

Die Ergebnisse der Überexpression von NL3 und NL4 legen nahe, dass erhöhte Level der beiden Proteine zu einer erhöhten Anzahl von Synapsen und zu stabileren und reiferen aktiven Zonen führen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorherigen Studien, die diese Funktionen für NL1 und NL2 darlegen konnten (Wittenmayer et al. 2009; Petkova et al. 2018).

Nichtsdestotrotz ist bis dato der Mechanismus der vermittelten Funktionen ungeklärt. Bezüglich der Stabilisierung aktiver Zonen sind mehrere Szenarien denkbar, durch welche Neuroligine die präsynaptische Reifung induzieren könnten. Da durch grundlegende Studien bereits die Wichtigkeit des Aktinzytoskeletts für die Stabilität von Präsynapsen und die diesbezüglichen Unterschiede in verschiedenen alten Kulturen gezeigt werden konnte (Zhang und Benson 2001), ist anzunehmen, dass hauptsächlich Aktin im Zentrum der Regulation synaptischer Reifung steht.

Dementsprechend besteht einerseits die Möglichkeit, dass Neuroligine zu einer deutlich erhöhten lokalen Konzentration von F-Aktin führen und andererseits die Option, dass Neuroligine eine weitgehende Unabhängigkeit der aktiven Zone von F-Aktin induzieren.

Es ist denkbar, dass durch eine Überexpression von NL3 und NL4 eine so hohe F-Aktinkonzentration an Präsynapsen herbeigeführt wird, dass die Behandlung mit Latrunculin A nicht genügt, um dieses stabilisierte Netzwerk zu depolymerisieren und die Synapsen als Konsequenz bestehen bleiben. Das dynamische Aktinsystem wird maßgeblich durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine beeinflusst, die entweder zur Polymerisation oder zur Depolymerisation führen können. So könnten Neuroligine also Aktin-depolymerisierende Proteine lokal hemmen und/oder Aktin-polymerisierende Proteine lokal stimulieren. Daraus ableitend stellt sich weiterhin die Frage nach der molekularen Vermittlung des Signals. Da Neuroligine interzellulär zur Präsynapse nur mit den Neurexinen in Verbindung stehen, ist anzunehmen, dass diese nach Bildung des Neuroligin-Neurexin-Komplexes in den Signalweg eingebunden sind. Tatsächlich konnte eine Studie an Larven der Taufliege (*Drosophila*) zeigen, dass Neurexine durch Aktivierung der Rac1-GTPase zu einer erhöhten Polymerisation von F-Aktin führen können (Rui et al. 2017). Die Rac1-GTPase aktiviert den sogenannten *WAVE-regulatory complex* (WRC), welcher wiederum über Aktivierung des Arp2/3-Signalwegs zur Aktinpolymerisation führt (Chen Z et al. 2010). Darüber hinaus bestünde hypothetisch die Möglichkeit, dass eine bisher unidentifizierte Interaktion zwischen Neurexinen oder deren Bindungspartnern und dem WRC vorliegt. Da bereits eine Interaktion zwischen dem Zelladhäsionsmolekül SYG-1 (Synaptogenesis protein-1) und dem WRC nachgewiesen werden konnte (Chia et al. 2014), ist es also denkbar dass auch weitere Adhäsionsmoleküle wie Neurexine mit diesem in Verbindung stehen und somit das Aktinzytoskelett beeinflussen.

Andererseits könnte die lokale Aktinkonzentration von Neuroliginen unbeeinflusst bleiben und der Effekt auf die Reifung der aktiven Zonen durch andere Mechanismen ablaufen.

Nimmt man an, dass die Behandlung von Latrunculin A auch das präsynaptische Aktinnetzwerk mehr oder weniger in Gänze depolymerisiert, die aktiven Zonen hingegen trotzdem bestehen bleiben, müsste die CAZ selbst stabilisiert werden. Auch in diesem Szenario ist die Interaktion der Neuroligine mit den Neurexinen von Relevanz. Es ist bekannt, dass Neurexine über ihre intrazelluläre Domäne an Vertreter der CAZ binden. So binden Neurexine CASK und Mint1 aus dem CASK-Mint1-VELIs-Komplex (Hata et al. 1996; Biederer und Südhof 2000). Neuroligine binden zeitgleich mit PSD-95, S-SCAM, Gephyrin und Collybistin Vertreter der postsynaptischen Gerüstproteine (vgl. Abschnitt 1.3). Eine erhöhte Konzentration an Neuroliginen an der postsynaptischen Membran könnte also über eine vermehrte Formation von Neuroligin-Neurexin-Komplexen zu einer vermehrten Bindung von Proteinen der CAZ untereinander führen, die über den interzellulären Kontakt zeitgleich indirekt mit postsynaptischen Gerüstproteinen verbunden ist. Dies würde mutmaßlich zu einer Festigung der Bindung zwischen den CAZ-Molekülen führen und die CAZ eventuell durch die transzelluläre Stabilisierung über Neuroligin-Neurexin-Komplexe von F-Aktin unabhängig oder weniger abhängig machen.

Es ist zudem nicht auszuschließen, dass sowohl die transzelluläre CAZ-Stabilisierung, als auch die Erhöhung von F-Aktin durch die genannten Mechanismen vermittelt werden. Um diesen Prozess genauer zu untersuchen, bietet sich eine Quantifizierung der Phalloidin-Färbeintensität an Synapsen oder gar die ultrastrukturelle Betrachtung des Aktinzytoskeletts in ähnlichen Experimenten an.

Potentielle Mechanismen der erhöhten Bildung von Synapsen

Ein weiterer beobachteter Effekt neben der Synapsenreifung war die Erhöhung der Synapsenzahl durch NL3 und NL4. Obwohl diese Beobachtung bereits mehrmals für verschiedene Neuroliginisoformen beschrieben wurde (Wittenmayer et al. 2009; Petkova et al. 2018), ist auch hier der Mechanismus noch unklar.

Eine denkbare Erklärung hierfür wäre eine Rolle von Neuroliginen in der chemotaktischen Richtungsweisung von *Growth cones* (vgl. Abschnitt 1.2). Diese Funktion von Neuroliginen wurde bisher noch nicht untersucht, könnte aber Hinweise geben warum ein erhöhtes Vorliegen von Neuroliginen zu einer erhöhten Synapsenzahl führt. Anschließend stellt sich die Frage wie, im Falle einer tatsächlichen chemotaktischen Funktion, die Synapsenbildung abläuft. Auch hier ist wieder eine Interaktion zwischen Neuroliginen und Neurexinen denkbar, indem *Growth cones* zu Loci mit starker Anreicherung von Neuroliginen gelotst werden und die entstehende Bindung über präsynaptische Neurexine vermittelt wird. Allerdings kann dieser Mechanismus nicht alleinig als Erklärung für den Effekt herangezogen werden, da Ko et al. (2009) zeigen konnten, dass die Synapsenbildung durch Neuroligine auch unabhängig von der Bindung zu Neurexinen möglich ist. Eventuell können Neuroligine auch über die Beeinflussung anderer postsynaptischer Moleküle die Synapsenbildung induzieren. Dieses Szenario scheint wahrscheinlich, da Studien belegen, dass das

synaptogenetische Potential von Neuroliginen zwar existiert, die Synapsenbildung jedoch nicht zwingend von deren Vorhandensein abhängt (Varoqueaux et al. 2006). Möglicherweise könnten also beispielsweise andere Adhäsionsmoleküle wie Cadherine oder Ephrine vermehrt durch Überexpression von Neuroliginen rekrutiert werden. Ephrine haben einen chemotaktischen Einfluss auf *Growth cones*, während Cadherine mit stabilisierenden Funktionen auf junge Synapsen in Verbindung gebracht wurden (vgl. Abschnitt 1.2). Zudem konnte bereits eine Interaktion zwischen Neuroliginen und N-Cadherin beobachtet werden (Aiga et al. 2011), welche dieser Theorie weitere Wahrscheinlichkeit einräumt.

Die Vielzahl an denkbaren Wegen unterstreicht die Annahme, dass zumindest teilweise unterschiedliche Signalwege für die Erhöhung der Synapsenzahl und der Induktion der Synapsenreifung vorliegen könnten. Die Ergebnisse der Experimente unter Überexpression von NL3-R451C legen diese Vermutung nahe, da die mutierte NL3-Variante zwar eine Resistenz gegenüber Latrunculin A induziert, die Synapsenzahl jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst lässt. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass zwei getrennte Signalwege vorliegen. Die Reifung von Synapsen scheint vornehmlich durch Beeinflussung von F-Aktin, entweder in Form einer erhöhten oder in Form einer verminderten Anreicherung, stattzufinden, während bei der Erhöhung der Synapsenzahl ein Zusammenspiel der Neuroligine mit anderen Molekülen oder eventuell über Chemotaxis denkbar ist.

Die Bedeutung der R451C-Mutation in NL3 für die Bildung und Reifung von Synapsen

Darüber hinaus bleibt zu diskutieren wie sich die beobachteten Effekte durch NL3-R451C erklären lassen. Für diese Mutation ist bekannt, dass sie bei Expression nur zu einem geringen Teil an die Zelloberfläche, also der physiologischen Lokalisation des Wildtyps, transportiert wird und ein Großteil am Endoplasmatischen Retikulum retiniert bleibt. Zudem kann der an die Zellmembran transportierte Teil nur eingeschränkt eine Bindung zu Neurexinen ausbilden (Chih et al. 2004; Comoletti et al. 2004). Aus dieser Beobachtung kann in Verbindung mit den zuvor geschilderten Erklärungsansätzen geschlussfolgert werden, dass Synapsen zwar weiterhin generiert werden können, da dieser Prozess auch unabhängig von Neurexinen möglich ist und nicht exklusiv durch Neuroligine vermittelt wird, die Zahl gegenüber der Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant erhöht ist.

Darüber hinaus ist denkbar, dass durch die niedrige, aber eingeschränkt mögliche, Bindung zu Neurexinen in Teilen eine eventuelle Vermittlung der Resistenz gegenüber Latrunculin A nach den zuvor beschriebenen Mechanismen stattfinden kann. Für diese partielle Reifung sprechen zudem die statistischen Daten. Während durch Expression des NL3-Wildtyps rund 90,5% der Synapsen nach Zugabe von Latrunculin A erhalten blieben, ließen sich bei NL3-R451C nur rund 75% der Synapsen nachweisen (vgl. Daten in Abschnitt 3.2). Zwar besteht bei NL3-R451C zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe nach Behandlung mit

Latrunculin A kein statistisch signifikanter Unterschied, anhand der zuvor genannten Rechnungen ist jedoch im Vergleich zu NL3 ein deutlicher Abwärtstrend sichtbar. Der Effekt auf die Synapsenreifung scheint also bei NL3-R451C deutlich weniger robust zu sein.

Anhand der Ergebnisse der durchgeführten Experimente konnte also ein weiterer von der physiologischen Funktion des Wildtyps abweichender Effekt von NL3-R451C festgestellt werden, der den pathologischen Kontext dieser Mutation weitergehend unterstreicht.

4.2 Einfluss von Neuroliginen auf das Recycling synaptischer Vesikel und vesikelassoziierte Proteine

Unter Verwendung verschiedener Assays und Färbung unterschiedlicher Proteinmarker, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von NL3 und NL3-R451C auf synaptische Vesikel untersucht. Es galt herauszufinden, ob neben der Beeinflussung der aktiven Zonen auch Effekte auf Vesikel und vesikelassoziierte Proteine abzuleiten sind.

Um die funktionelle Reifung von Synapsen zu testen, wurde ein Assay verwendet, in welchem lebenden Zellen in einem Stimulationspuffer Antikörper gegen den luminalen Teil des integralen Vesikelmembranproteins Synaptotagmin-1 zugeführt werden (Riemann et al. 2018). Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass bei Überexpression von NL3 eine signifikant gesteigerte Intensität des Antikörpers gegenüber der Kontrollgruppe vorliegt, während NL3-R451C diesen Effekt nicht zu zeigen scheint. NL3 erhöht also den Vesikelumsatz in Präsynapsen und weist damit eine analoge Funktion zu NL1 und NL2 auf (Petkova et al. 2018). Aufbauend auf dieser Beobachtung stellt sich die Frage, wie Neuroligine diesen Effekt vermitteln könnten. Es ist anzunehmen, dass, wie bereits in Abschnitt 4.1 gemutmaßt, eine erhöhte Akkumulation von Neuroliginen an Postsynapsen zu einer vermehrten Bildung von Neuroligin-Neurexin-Komplexen führt. Neurexine können präsynaptisch in unmittelbarem Kontakt mit Vesikeln gelangen, da sie das vesikelassoziierte Protein Synaptotagmin-1 direkt binden können (Hata et al. 1993). Somit ist anzunehmen, dass Vesikel, die sich ohnehin in der Nähe der aktiven Zone befinden, also zum *Readily releasable pool* oder zum *Recycling pool* gehören, durch vermehrte Interaktionen mit Neurexinen an die aktive Zone angenähert werden können und es zu einer erhöhten Fusionsrate kommt. Die Stabilisierung von Vesikeln an aktiven Zonen durch Neurexine wurde bereits in anderen Arbeiten postuliert (Craig und Kang 2007). Diese Annahme kann zusätzlich durch die Beobachtung gestützt werden, dass ein Knockdown von Neurexinen zu einer abnehmenden Größe des *Readily releasable pools* führt (Quinn et al. 2017). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Neurexine essentiell für die physiologisch korrekte Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen der aktiven Zone sind und eine eingeschränkte Neurexinfunktion zu einer gestörten Freisetzung von Neurotransmittern führt (Missler et al. 2003). Es kann also angenommen werden, dass die durch Überexpression von Neuroliginen vermehrte Anzahl an Neuroligin-Neurexin-Komplexen sowohl die Fusionsbereitschaft synaptischer Vesikel

erhöht, als auch für einen physiologischen Einstrom von Calciumionen zur Auslösung der Vesikelfusion sorgen kann.

Zudem ist zu bemerken, dass für NL1 bereits getestet wurde, ob sich die Aufnahme des Synaptotagmin-1-Antikörpers zwischen dem Wildtyp und einer mutierten Variante, die Neurexine nicht binden kann, unterscheidet. Diese Studie konnte darlegen, dass für die Erhöhung des Vesikelrecyclings die Ausbildung von Neuroligin-Neurexin-Komplexen notwendig ist und nicht unabhängig von Neurexinen vermittelt werden kann (Ko et al. 2009). Dieses Erkenntnis kann als Erklärung für das unveränderte Vesikelrecycling bei Überexpression von NL3-R451C herangezogen werden, da für diese Mutation bereits bekannt ist, dass sie nur in eingeschränktem Maße an Neurexine binden kann (vgl. Abschnitt 4.1).

Neuroligine und die Latrunculin-Resistenz synaptischer Vesikelproteine

Als Marker für synaptische Vesikel im Latrunculin A Assay wurde Synaptophysin als integrales Membranprotein der Vesikel verwendet. Die Kontrollgruppen zeigen in diesem Experiment ein zu erwartendes Verhalten. Bei Depolymerisation von Aktin durch Latrunculin A verringern sich die Synaptophysinsignale und damit die Anzahl synaptischer Vesikel. Dies ist zu erwarten, da bereits bekannt ist, dass ein Großteil der Vesikel am Aktinzytoskelett befestigt ist (Rizzoli und Betz 2005). Dementsprechend sollte eine Depolymerisation von Aktin eine Abnahme der Vesikelanzahl nach sich ziehen. Bei Überexpression von NL3 wird ein vergleichbarer Effekt beobachtet. Dies könnte einerseits als Indikator für ein auch lokal nicht stabilisiertes Aktinnetz dienen und dafürsprechen, dass der in Abschnitt 4.1 diskutierte Mechanismus der Synapsenreifung tatsächlich durch eine stabilisierte CAZ und nicht durch lokal stabilisiertes Aktin vermittelt wird. Andererseits ist diese Theorie jedoch nicht zu verwerfen, da eventuell die Möglichkeit besteht, dass Aktin in Nähe der CAZ und der Zellmembran stabilisiert wird, jedoch weiter zentral in der Synapse gelegenes Aktin keine Resistenz gegen Latrunculin A aufweist und die Vesikel als Konsequenz nicht mehr stabilisiert werden können. Unter dieser Annahme würden also insbesondere über Aktin stabilisierte Vesikel des *Reserve pools* verschwinden, während näher an der Membran gelegene Vesikel erhalten blieben. Dafür spricht zudem die Beobachtung, dass in den vorliegenden Experimenten die Synaptophysinsignale zwar reduziert werden, aber nicht gänzlich verschwinden. Somit bleibt möglicherweise ein Teil der Vesikel erhalten. Diese Annahme bedarf jedoch weiterer intensiver Experimente und ultrastruktureller Untersuchungen.

Zudem ist festzustellen, dass NL3-R451C zumindest statistisch eine Resistenz gegenüber Latrunculin A induziert. Dies ist allerdings unter Berücksichtigung der diskutierten Mechanismen und der subzellulären Lokalisation von NL3-R451C eher unwahrscheinlich. Hingegen scheint die ohnehin geringe Anzahl an Synaptophysinsignalen bei NL3-R451C-Kulturen durch Latrunculin A nicht noch weiter reduziert zu werden.

Als möglicher Vermittler zwischen Vesikeln und dem Zytoskelett (vgl. Abschnitt 1.1) wurden des Weiteren Synapsin-1 und -2 im Latrunculin A Assay untersucht. Gegenüber der Kontrollgruppe führt die vermehrte Expression von NL3 zu einer gesteigerten Dichte an Synapsinsignalen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnisse von Scheiffele et al. (2000), die zeigen konnten, dass Neurologinexpression in nicht-neuronalen Zellen zu einer Rekrutierung von Synapsin zu gebildeten Synapsen mit nahegelegenen Axonen führt. Darüber hinaus ist nachzuvollziehen, dass in allen drei Gruppen statistisch eine Resistenz gegen Zugabe von Latrunculin A besteht. Allerdings ist dieses Ergebnis kritisch zu bewerten, da insbesondere für die GFP-Kontrollgruppe und für NL3 ein deutlicher Abwärtstrend der Synapsinsignale bei Zugabe von Latrunculin A sichtbar ist. Eine vollständige Resistenz ist daher unwahrscheinlich. Für NL3-R451C ist dieser zwar nicht sichtbar, es ist aber eventuell eine ähnliche Erklärung wie im Synaptophysin-Experiment denkbar. Somit würde das ohnehin niedrige Synapsinsignal nach Behandlung mit Latrunculin A nicht weiter reduziert werden. Nichtsdestotrotz ist eine Resistenz gegen Latrunculin A nicht auszuschließen. Jedoch stellt sich in dem Fall die Frage, wie Synapsin an der Synapse gehalten wird, wenn die Vesikel verschwinden und das Aktinzytoskelett depolymerisiert wird. Dagegen spricht die Tatsache, dass Synapsin entweder vesikelgebunden an Synapsen vorliegt oder bei fehlender Vesikelinteraktion von der Synapse weg ins Axon diffundiert (Chi et al. 2001). Zudem konnten andere Experimente ebenfalls zeigen, dass Latrunculin A zu einer Abnahme von Synapsinsignalen führt (Sankaranarayanan et al. 2003). Dies macht eine Resistenz von Synapsin, auch bei Überexpression von Neurologinen, unwahrscheinlich.

Neben den vorigen Experimenten wäre die Bestimmung der von NL3 und NL3-R451C beeinflussten Synapsentypen wichtig gewesen. Es ist zwar bekannt, dass NL3 sich an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen findet, jedoch werden beide möglicherweise unterschiedlich von einer Überexpression beeinflusst. Zu diesem Zweck sollten VGAT und VGlut1 als Marker für inhibitorische respektive exzitatorische Synapsen im Rahmen der Überexpression getestet werden. Jedoch zeigte sich an DIV 5 keine punktförmige Anreicherung dieser Proteine, weshalb die verwendeten Antikörper an DIV 14 in reifen, untransfizierten Kulturen geprüft wurden. Hier konnte die vermutete punktuelle und nicht kolokalisierende Anreicherung beider Marker verifiziert werden. Dementsprechend ist zum einen denkbar, dass die Proteine an DIV 5 in den untersuchten Kulturen noch nicht exprimiert sind und die geringen Signale auf unspezifische Hintergrundfärbung der Antikörper zurückzuführen ist. Zum anderen ist es möglich, dass die Proteine zwar exprimiert sind, aber an DIV 5 noch nicht an Synapsen angereichert vorliegen, sondern homogen in der Zelle verteilt sind beziehungsweise in Richtung der Synapsen transportiert werden. Es gilt allerdings zu beachten, dass in anderen Studien VGAT und VGluts in jungen Kulturen untersucht wurden (Chih et al. 2005; Wittenmayer et al. 2009; Fekete et al. 2015). Um auszuschließen, dass sich die Beobachtungen in einem abweichenden Expressionsmuster dieser Proteine in den untersuchten Kulturen ergünden, könnten

molekularbiologische Analysen wie die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot zielführend sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NL3 den Vesikelumsatz erhöht, während NL3-R451C diesen Effekt nicht induziert. Zudem zeigt sich, dass beide Proteine wahrscheinlich keine vollständige Resistenz synaptischer Vesikel gegenüber Behandlung mit Latrunculin A induzieren, wobei dieser Aspekt weiterer Untersuchungen bedarf. Auch die synapsentypspezifische Beeinflussung bleibt anhand der vorliegenden Ergebnisse offen.

4.3 Neuroligine als Regulatoren der Dendritenmorphologie

Um neben den funktionellen und morphologischen Untersuchungen der Synapsen Hinweise auf Einflüsse der Überexpression von NL3 und NL3-R451C auf die Neuronmorphologie zu erhalten, wurden die untersuchten Zellen mittels Sholl-Analyse auf ihre Dendritenverzweigung geprüft. NL3 induzierte eine erhöhte Verzweigung im proximalen und distalen Bereich, während die Mutante nur zu einer Erhöhung im proximalen Bereich führte.

Bereits seit längerer Zeit wird eine Rolle von synaptischen Molekülen in der Dendritenbildung angenommen, sodass Vaughn (1989) die synaptotrope Hypothese aufstellte, die auf der Beobachtung beruht, dass Verzweigungspunkte von Dendriten oftmals von Orten ausgehen, an welchen sich Synapsen bilden. Mittlerweile ist bekannt, dass die Aktivität und Reifung von zumindest glutamatergen Synapsen zur Bildung und Verzweigung von Dendriten beiträgt (Cline und Haas 2008). Da Neuroligine, wie bereits in den vorigen Experimenten dargelegt werden konnte, die Reifung von Synapsen maßgeblich beeinflussen und NL3 zudem unter anderem an glutamatergen Synapsen lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 1.3.3), ist eine Beteiligung in der Dendritenbildung naheliegend.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Neurexin-NL1-Komplexen auf die Bildung von Dendriten bereits in Studien gezeigt. Es wird angenommen, dass die gebildeten Komplexe den axodendritischen Kontakt stabilisieren, die postsynaptische Maschinerie rekrutieren und anschließend aktivitätsabhängig die lokale Dendritenverzweigung beeinflussen (Chen SX et al. 2010). Da bereits mehrere überschneidende Funktionen für NL1 und NL3 ausgemacht werden konnten und das vorliegende Experiment die Erhöhung der Dendritenverzweigung durch NL3 zeigt, ist auch hier ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Dies könnte zudem als Erklärung für die geringer ausgeprägte Dendritenverzweigung durch NL3-R451C dienen, da die Mutation die Bindung mit Neurexinen stark einschränkt (vgl. Abschnitt 1.3.3).

Allerdings sollte beachtet werden, dass andere Studien bisher teilweise gegensätzliche Ergebnisse für NL3 und NL3-R451C vorweisen. So führten ein Knockout von NL3 und eine Überexpression von NL3-R451C zu einer erhöhten Dendritenverzweigung (Etherton et al. 2011; Xu et al. 2019). Diese widersprüchlichen Ergebnisse unterstreichen das Ausmaß an verbleibenden offenen Fragen und die Wichtigkeit für tiefergehende Untersuchungen, um

eine differenzierte Aussage über die Funktion der Proteine in Hinblick auf die Dendritenbildung treffen zu können.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der molekularen Vermittlung der Effekte. Es ist bereits bekannt, dass die Dendritenbildung und -morphogenese entscheidend von der Beeinflussung des Aktinzytoskeletts abhängt. In dieser Funktion konnte zudem die Beteiligung des WRC-Arp2/3-Signalwegs nachgewiesen werden (Chia et al. 2014). Darüber hinaus ist Arp2/3 unter anderem postsynaptisch lokalisiert (Chazeau et al. 2014) und NL1 weist intrazellulär eine WRC-Bindungsdomäne auf (Chen et al. 2014). Dementsprechend ist möglicherweise auch für NL3 hier eine Interaktion denkbar.

4.4 Neuroligine im Zusammenspiel mit BDNF

Um den Hintergrund der Interaktion von Neuroliginen und BDNF konzeptionell weiter zu verfolgen, bediente man sich in der vorliegenden Untersuchung dem Fusionsprotein TrkB-Fc, welches als löslicher BDNF-Rezeptor sezerniertes BDNF bindet und somit dessen Wirkung auf die kultivierten Neurone inhibiert. Die alleinige Applikation von TrkB-Fc zu NL3- und NL3-R451C-überexprimierenden Kulturen konnte eine eingeschränkte Fähigkeit der Zellen zur Erhöhung der Synapsenzahl zeigen, während eine mit Latrunculin A kombinierte Anwendung von TrkB-Fc auf jenen Zellkulturen eine Inhibierung der Synapsenreifung nach sich zog. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass BDNF als Co-Signal vorliegen muss, damit NL3 und NL3-R451C ihre zuvor beschriebenen Effekte auf Synapsen in vollem Umfang ausführen können.

Diese hier erstmalig beschriebenen Beobachtungen betten die Funktion der beiden Proteine in die Erkenntnisse bereits bestehende Studien zu den Neuroliginisoformen NL1 und NL2 ein, welche ebenfalls vom BDNF-Signal abhängen (Petkova et al. 2018). Zeitgleich lassen die Ergebnisse weitere Schlussfolgerung in Hinblick auf unterschiedliche Funktionen der Neuroligine zu. In der zuvor genannten Studie führte die Inhibierung von BDNF zu einer eingeschränkten präsynaptischen Reifung durch NL1 und NL2, während sie nur bei NL2 zu einer eingeschränkten Fähigkeit der Synapsenbildung führte. NL3 scheint dementsprechend vergleichbare Effekte wie NL2 zu induzieren und feine Unterschiede im Vergleich zur Funktion von NL1 aufzuweisen.

Für NL3-R451C zeigt sich bei Mangel an BDNF eine noch weitergehende Einschränkung seiner ohnehin defizitären Funktion. Die Unfähigkeit von NL3-R451C bei alleiniger Überexpression die Synapsenzahl zu erhöhen, wird durch BDNF verstärkt, sodass effektiv deutlich weniger Synapsen vorliegen. Die gemessene Synapsendichte der NL3-R451C-Kulturen ähneln der GFP-F-Kontrollgruppe, was abermals die nahezu ausbleibenden Effekte auf die Synapsenbildung durch die Mutante unterstreicht.

Es stellt sich anschließend die Frage welche Rolle BDNF im Zusammenhang mit Neuroliginen unter physiologischen Bedingungen spielt. Durch Petkova et al. (2018) wurden

drei mögliche Signalwege postuliert: BDNF könne entweder unabhängig in einem eigenständigen, in überlappenden oder in einem gemeinsamen Signalweg mit Neuroliginen wirken. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann bezüglich eines Mechanismus nur gemutmaßt werden, da für eine abschließende Bewertung zu viele Zusammenhänge von NL3 und BDNF unbekannt bleiben. So ist beispielsweise nicht bekannt inwiefern BDNF bei einem Knockout von NL3 analog zu NL1 für die ausbleibenden Wirkungen der Neuroligine kompensieren kann.

Durch Dong et al. (2012) wurden BDNF und sein Rezeptor TrkB mit der Aktivierung von LIMK1 (LIM-domain kinase 1) und anschließender Phosphorylierung von Cofilin über Rho-GTPasen und nachfolgender Aktinpolymerisation in Zusammenhang gebracht. Dies könnte für eine zentrale Rolle von BDNF in der Modulation des präsynaptischen Aktinzytoskeletts sprechen. Wie in Abschnitt 4.1 bereits erörtert, könnte die Synapsenreifung durch NL3 unter anderem auf einer Erhöhung und Stabilisierung von präsynaptischem Aktin über Neuroigin-Neurexin-Kontakte und den WRC-Arp2/3-Signalweg basieren. Es ist dementsprechend denkbar, dass NL3 und BDNF synergetische Effekte auf das Aktinzytoskelett haben und so die Synapsenreifung beeinflussen. BDNF könnte möglicherweise eine fundamentale Rolle als Signalgeber und -verstärker dieses Mechanismus einnehmen.

Darüber hinaus wurde von Petkova et al. (2018) diskutiert, dass ein überlappender Signalweg von BDNF und NL1 darin bestehen könnte, dass beide Moleküle eine erhöhte NMDAR-Aktivität induzieren und der anschließenden Calciumioneneinstrom zur Aktivierung von CaMKII führt. CaMKII wiederum könne die Expression von BDNF erhöhen und NL1 an die Zelloberfläche rekrutieren. Jedoch konnte im Gegensatz zu NL1 (Bemben et al. 2014) für NL3 noch keine Interaktion mit CaMKII nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse einen engen Zusammenhang von NL3 und BDNF. Jedoch konnte diese Untersuchung vorerst nur den Grundstein in der Untersuchung dieser Interaktion legen und es bedarf weiterer intensiver Forschung, um sowohl für NL3, als auch für andere Neuroiginisofomen und mutierte Varianten einen detaillierten Einblick in die Signalgebung in Zusammenhang mit BDNF geben zu können.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte durch Anwendung unterschiedlicher experimenteller Methoden Hinweise auf grundlegende Funktionen der Proteine NL3, NL4 und der mutierten Variante NL3-R451C an neuronalen Synapsen und umgebenden Strukturen geben.

Nichtsdestotrotz bleiben weitere Fragen offen, die insbesondere die molekularen Signalwege und das Zusammenspiel der untersuchten Proteine mit anderen Molekülen betreffen. Darüber hinaus bieten die Ergebnisse zu NL3-R451C Raum für weitere Studien bezüglich

dessen pathologischer Relevanz und pathophysiologischer Funktion im Zusammenhang mit Autismus-Spektrum-Störungen.

Unmittelbar auf die Ergebnisse der vorliegenden Experimente aufbauend, bieten sich Untersuchungen zum Mechanismus der Synapsenreifung durch Neuroligine an, da diese nun zwar für alle Isoformen belegt werden konnte, molekulare Signalwege allerdings unbekannt bleiben. Um die tatsächliche Rolle des Aktinzytoskeletts in der Reifungsinduktion zu testen, könnte beispielsweise eine Phalloidin-färbung in analogen Experimenten fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden oder gar hochauflösende Verfahren herangezogen werden, um die lokal synaptische Aktinanreicherung zu determinieren. Auch NL3-Knockoutkulturen könnten weitere Hinweise zu dessen biologischen Eigenschaften geben, insbesondere in Hinblick auf die Fragestellung ob eine Überexpression von BDNF in diesen Kulturen für die eventuell ausbleibenden Wirkungen kompensieren kann. An diese Experimente könnten sich Studien zur Aufklärung des molekularen Signalwegs von Neuroliginen und BDNF anschließen, die fundamental wichtig für das Verständnis der Synapsenreifung wären.

Darüber hinaus bleiben die für NL3 und NL3-R451C untersuchten Fragestellungen für NL4 und relevante Mutationen dieses Proteins zu klären.

Insbesondere in Hinblick auf die klinische Relevanz der NL3-R451C Mutation wären Untersuchungen zur synapsenspezifischen Beeinflussung nötig. Eine eventuelle unterschiedliche Beeinflussung von exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen unter Beachtung der E/I-Ratio (vgl. Abschnitt 1.3.3) könnten zur Aufklärung des molekularen Pathomechanismus von ASD beitragen.

5 Zusammenfassung

Die Neuroligine sind eine Gruppe postsynaptischer Zelladhäsionsmoleküle, deren Vertreter in Zusammenhang mit der Bildung, Reifung und Funktion von Synapsen gebracht werden. Mehrere Isoformen stehen mit Autismus-Spektrum-Störungen in Verbindung.

Neurologin 1 ist essentiell für die Reifung präsynaptischer Endigungen. Eine vergleichbare Rolle wurde kürzlich auch für Neurologin 2 beschrieben. Bei den Isoformen Neurologin 3 und 4 ist der Einfluss auf die präsynaptische Reifung bisher nicht untersucht worden, ebenso wenig wie bei der mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziierten Mutation NL3-R451C.

Auf Basis dieser vorliegenden Daten wurden in dieser Arbeit folgende Fragen gestellt: Sind Neurologin 3 und 4 auch an der präsynaptischen Reifung beteiligt? Hat die Mutante diesbezüglich ein Defizit? Haben diese Isoformen Auswirkungen auf die neuronale Morphologie? Gibt es einen für alle Neuroligine gemeinsamen transsynaptischen Signalweg?

Hierzu wurden rekombinante Neuroliginkonstrukte in primären hippocampalen Zellkulturen überexprimiert und immunhistochemisch untersucht, um mittels verschiedener zellbiologischer Verfahren den Effekt auf die präsynaptische Reifung zu testen.

Es zeigte sich, dass Neurologin 3 und 4 analog zu Neurologin 1 und 2 nicht nur zu einer Erhöhung der Synapsenzahl führen, sondern auch präsynaptische aktive Zonen stabilisieren. Zwar zeigte die NL3-R451C-Mutante einen vergleichbaren Effekt auf aktive Zonen, erhöhte aber die Synapsenzahl nicht. Im weiteren Verlauf konzentrierten sich die Untersuchungen auf Neurologin 3 und die Mutante. Im Gegensatz zu Neurologin 3 konnte die Mutante die funktionelle Reifung von Präsynapsen nicht steigern. Während sowohl Neurologin 3, als auch die Mutante eine vermehrte lokale Stabilisierung von Synapsin an Präsynapsen induzierten, wurde dieser Effekt für Synaptophysin nur bei der Mutante beobachtet. Das Ausmaß der Dendritenverzweigung wurde durch Neurologin 3 im proximalen und distalen Bereich erhöht, durch die Mutante hingegen nur im proximalen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Effekte von Neurologin 3 und der Mutante bei Inhibition des brain-derived neurotrophic factor nicht vermittelt werden können.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Neurologin 3 und 4 auch an der strukturellen präsynaptischen Reifung beteiligt sind. Außerdem steigert Neurologin 3 die funktionelle präsynaptische Reifung, während die Mutante lediglich zur Reifung aktiver Zonen beiträgt. Im Hinblick auf die Stabilisierung von Vesikelmarkern sowie die Dendritenmorphologie zeigen Neurologin 3 und die Mutante teils abweichende Funktionen. Zudem hängt die Vermittlung der Effekte beider Moleküle maßgeblich vom brain-derived neurotrophic factor ab.

Die Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit den therapeutischen Nutzen von löslichen Neurotrophinen für Autismus-Spektrum-Störungen weiter zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000): Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3, 445–451
- Aiga M, Levinson JN, Bamji SX (2011): N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *J Biol Chem* 286, 851–858
- Ali H, Marth L, Krueger-Burg D (2020): Neuroligin-2 as a central organizer of inhibitory synapses in health and disease. *Sci Signal* 13
- Allen NJ, Eroglu C (2017): Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96, 697–708
- Andreska T, Aufmkolk S, Sauer M, Blum R (2014): High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci* 8, 107
- Archer BT, Ozçelik T, Jahn R, Francke U, Südhof TC (1990): Structures and chromosomal localizations of two human genes encoding synaptobrevins 1 and 2. *J Biol Chem* 265, 17267–17273
- Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N (1999): Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457–461
- Babaev O, Botta P, Meyer E, Müller C, Ehrenreich H, Brose N, Lüthi A, Krueger-Burg D (2016): Neuroligin 2 deletion alters inhibitory synapse function and anxiety-associated neuronal activation in the amygdala. *Neuropharmacology* 100, 56–65
- Bähler M, Greengard P (1987): Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326, 704–707
- Barrow SL, Constable JR, Clark E, El-Sabeawy F, McAllister AK, Washbourne P (2009): Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4, 17
- Batool S, Raza H, Zaidi J, Riaz S, Hasan S, Syed NI (2019): Synapse formation: from cellular and molecular mechanisms to neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *J Neurophysiol* 121, 1381–1397
- Bemben MA, Shipman SL, Hirai T, Herring BE, Li Y, Badger JD, Nicoll RA, Diamond JS, Roche KW (2014): CaMKII phosphorylation of neuroligin-1 regulates excitatory synapses. *Nat Neurosci* 17, 56–64
- Bemben MA, Shipman SL, Nicoll RA, Roche KW (2015): The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends Neurosci* 38, 496–505
- Benson DL, Tanaka H (1998): N-Cadherin Redistribution during Synaptogenesis in Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 18, 6892–6904
- Biederer T, Südhof TC (2000): Mints as adaptors. Direct binding to neuroligins and recruitment of munc18. *J Biol Chem* 275, 39803–39806

- Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC (2002): SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297, 1525–1531
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF (1997): Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 284–288
- Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC (1995): Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem* 270, 25273–25280
- Budreck EC, Scheiffele P (2007): Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci* 26, 1738–1748
- Butz S, Okamoto M, Südhof TC (1998): A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94, 773–782
- Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC (1996): Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* 69, 214–223
- Cellot G, Cherubini E (2014): Reduced inhibitory gate in the barrel cortex of Neuroligin3R451C knock-in mice, an animal model of autism spectrum disorders. *Physiol Rep* 2
- Chanda S, Aoto J, Lee S-J, Wernig M, Südhof TC (2016): Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroligin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking. *Molec Psychiat* 21, 169–177
- Charych EI, Akum BF, Goldberg JS, Jörnsten RJ, Rongo C, Zheng JQ, Firestein BL (2006): Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J Neurosci* 26, 10164–10176
- ChazEAU A, Mehidi A, Nair D, Gautier JJ, Leduc C, Chamma I, Kage F, Kechkar A, Thoumine O, Rottner K, et al. (2014): Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J* 33, 2745–2764
- Chen B, Brinkmann K, Chen Z, Pak CW, Liao Y, Shi S, Henry L, Grishin NV, Bogdan S, Rosen MK (2014): The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* 156, 195–207
- Chen SX, Tari PK, She K, Haas K (2010): Neurexin-neuroligin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo. *Neuron* 67, 967–983
- Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, Umetani J, Billadeau DD, Otwinowski Z, Rosen MK (2010): Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468, 533–538
- Chi P, Greengard P, Ryan TA (2001): Synapsin dispersion and reclustered during synaptic activity. *Nat Neurosci* 4, 1187–1193
- Chi P, Greengard P, Ryan TA (2003): Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 38, 69–78

- Chia PH, Chen B, Li P, Rosen MK, Shen K (2014): Local F-actin network links synapse formation and axon branching. *Cell* 156, 208–220
- Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P (2004): Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet* 13, 1471–1477
- Chih B, Engelman H, Scheiffele P (2005): Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307, 1324–1328
- Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992): The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 2, 929–942
- Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC (2007): Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron* 54, 919–931
- Cline H, Haas K (2008): The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis. *J Physiol* 586, 1509–1517
- Comoletti D, De Jaco A, Jennings LL, Flynn RE, Gaietta G, Tsigelny I, Ellisman MH, Taylor P (2004): The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *J Neurosci* 24, 4889–4893
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED (1987): Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* 213, 316–318
- Craig AM, Kang Y (2007): Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 17, 43–52
- Croll SD, Chesnutt CR, Rudge JS, Acheson A, Ryan TE, Siuciak JA, DiStefano PS, Wiegand SJ, Lindsay RM (1998): Co-infusion with a TrkB-Fc receptor body carrier enhances BDNF distribution in the adult rat brain. *Exp Neurol* 152, 20–33
- Dean C, Dresbach T (2006): Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 29, 21–29
- Dean C, Scholl FG, Choih J, DeMaria S, Berger J, Isacoff E, Scheiffele P (2003): Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6, 708–716
- Dean C, Dunning FM, Liu H, Bomba-Warczak E, Martens H, Bharat V, Ahmed S, Chapman ER (2012): Axonal and dendritic synaptotagmin isoforms revealed by a pHluorin-syt functional screen. *Mol Biol Cell* 23, 1715–1727
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde Y-A (2012): BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196, 775–788
- Dong Q, Ji Y-S, Cai C, Chen Z-Y (2012): LIM kinase 1 (LIMK1) interacts with tropomyosin-related kinase B (TrkB) and Mediates brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced axonal elongation. *J Biol Chem* 287, 41720–41731

- Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001): The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* 58, 94–116
- Ernfors P, Kucera J, Lee KF, Loring J, Jaenisch R (1995): Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol* 39, 799–807
- Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC (2011): Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13764–13769
- Fekete CD, Chiou T-T, Miralles CP, Harris RS, Fiondella CG, Loturco JJ, De Blas AL (2015): In vivo clonal overexpression of neuroligin 3 and neuroligin 2 in neurons of the rat cerebral cortex: Differential effects on GABAergic synapses and neuronal migration. *J Comp Neurol* 523, 1359–1378
- Feng W, Zhang M (2009): Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 10, 87–99
- Ferreira TA, Blackman AV, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, Sjöström PJ, van Meyel DJ (2014): Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods* 11, 982–984
- Frei JA, Andermatt I, Gesemann M, Stoeckli ET (2014): The SynCAM synaptic cell adhesion molecules are involved in sensory axon pathfinding by regulating axon-axon contacts. *J Cell Sci* 127, 5288–5302
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE (2000): Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27, 57–69
- Fu Z, Vicini S (2009): Neuroligin-2 accelerates GABAergic synapse maturation in cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci* 42, 45–55
- Fykse EM, Takei K, Walch-Solimena C, Geppert M, Jahn R, De Camilli P, Südhof TC (1993): Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J Neurosci* 13, 4997–5007
- Goda Y, Davis GW (2003): Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40, 243–264
- Gomez TM, Letourneau PC (2014): Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J Neurochem* 129, 221–234
- Graf ER, Zhang X, Jin S-X, Linhoff MW, Craig AM (2004): Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119, 1013–1026
- Graham FL, van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456–467
- Groeneweg FL, Trattnig C, Kuhse J, Nawrotzki RA, Kirsch J (2018): Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. *Histochem Cell Biol* 150, 489–508
- Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R (2011): RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69, 304–316

- Harris KM, Weinberg RJ (2012): Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
- Hata Y, Davletov B, Petrenko AG, Jahn R, Südhof TC (1993): Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neuroligins. *Neuron* 10, 307–315
- Hata Y, Butz S, Südhof TC (1996): CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J Neurosci* 16, 2488–2494
- Hirao K, Hata Y, Ide N, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Südhof TC, Takai Y (1998): A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J Biol Chem* 273, 21105–21110
- Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt K-F, Sassoè-Pognetto M, Löwel S, Moser T, Taschenberger H, et al. (2011): Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3053–3058
- Huang EJ, Reichardt LF (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677–736
- Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Südhof TC (1997): Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277, 1511–1515
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, et al. (2003): Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34, 27–29
- Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, Varoqueaux F, Ramanantsoa N, Gallego J, Ronnenberg A, Winter D, et al. (2008): Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1710–1715
- Jiang M, Chen G (2006): High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc* 1, 695–700
- Kao HT, Porton B, Hilfiker S, Stefani G, Pieribone VA, DeSalle R, Greengard P (1999): Molecular evolution of the synapsin gene family. *J Exp Zool* 285, 360–377
- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997): GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136, 669–678
- Kins S, Betz H, Kirsch J (2000): Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat Neurosci* 3, 22–29
- Knaus P, Marquèze-Pouey B, Scherer H, Betz H (1990): Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* 5, 453–462
- Ko J, Zhang C, Arac D, Boucard AA, Brunger AT, Südhof TC (2009): Neuroligin-1 performs neuroligin-dependent and neuroligin-independent functions in synapse validation. *EMBO J* 28, 3244–3255

- Koenig JH, Ikeda K (1996): Synaptic vesicles have two distinct recycling pathways. *J Cell Biol* 135, 797–808
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995): Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737–1740
- Krueger DD, Tuffy LP, Papadopoulos T, Brose N (2012): The role of neuroligins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr Opin Neurobiol* 22, 412–422
- Levinson JN, Chéry N, Huang K, Wong TP, Gerrow K, Kang R, Prange O, Wang YT, El-Husseini A (2005): Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. *J Biol Chem* 280, 17312–17319
- Liang J, Xu W, Hsu Y-T, Yee AX, Chen L, Südhof TC (2015): Conditional neuroligin-2 knockout in adult medial prefrontal cortex links chronic changes in synaptic inhibition to cognitive impairments. *Molec Psychiat* 20, 850–859
- Lilja J, Ivaska J (2018): Integrin activity in neuronal connectivity. *J Cell Sci* 131
- Marro SG, Chanda S, Yang N, Janas JA, Valperga G, Trotter J, Zhou B, Merrill S, Yousif I, Shelby H, et al. (2019): Neuroligin-4 Regulates Excitatory Synaptic Transmission in Human Neurons. *Neuron* 103, 617-626.e6
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (1995): Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15, 791–803
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Südhof TC (2003): Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423, 939–948
- Mondin M, Labrousse V, Hosy E, Heine M, Tessier B, Levet F, Poujol C, Blanchet C, Choquet D, Thoumine O (2011): Neurexin-neuroligin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J Neurosci* 31, 13500–13515
- Monier S, Jollivet F, Janoueix-Lerosey I, Johannes L, Goud B (2002): Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* 3, 289–297
- Mortimer D, Fothergill T, Pujic Z, Richards LJ, Goodhill GJ (2008): Growth cone chemotaxis. *Trends Neurosci* 31, 90–98
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M (1999): Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23, 569–582
- Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M (1999): Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 97–103
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (2002): Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158, 577–590

- Olofsson B, Chardin P, Touchot N, Zahraoui A, Tavitian A (1988): Expression of the ras-related *ralA*, *rho12* and *rab* genes in adult mouse tissues. *Oncogene* **3**, 231–234
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC (1989): The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* **109**, 3039–3052
- Ozçelik T, Lafreniere RG, Archer BT, Johnston PA, Willard HF, Francke U, Südhof TC (1990): Synaptophysin: structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. *Am J Hum Genet* **47**, 551–561
- Park H, Poo M (2013): Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* **14**, 7–23
- Petkova A, Gödecke N, Korte M, Dresbach T (2018): Neuroligins mediate presynaptic maturation through brain-derived neurotrophic factor signaling. *bioRxiv* 262246
- Pizzarelli R, Griguoli M, Zacchi P, Petrini EM, Barberis A, Cattaneo A, Cherubini E (2020): Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience* **439**, 125–136
- Poulopoulos A, Aramuni G, Meyer G, Soykan T, Hoon M, Papadopoulos T, Zhang M, Paarmann I, Fuchs C, Harvey K, et al. (2009): Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* **63**, 628–642
- Poulopoulos A, Soykan T, Tuffy LP, Hammer M, Varoqueaux F, Brose N (2012): Homodimerization and isoform-specific heterodimerization of neuroligins. *Biochem J* **446**, 321–330
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J (1992): Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* **8**, 1161–1170
- Qu L, Akbergenova Y, Hu Y, Schikorski T (2009): Synapse-to-synapse variation in mean synaptic vesicle size and its relationship with synaptic morphology and function. *J Comp Neurol* **514**, 343–352
- Quartier A, Courraud J, Thi Ha T, McGillivray G, Isidor B, Rose K, Drouot N, Savidan M-A, Feger C, Jagline H, et al. (2019): Novel mutations in *NLGN3* causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. *Hum Mutat* **40**, 2021–2032
- Quinn DP, Kolar A, Wigerius M, Gomm-Kolisko RN, Atwi H, Fawcett JP, Krueger SR (2017): Pan-neurexin perturbation results in compromised synapse stability and a reduction in readily releasable synaptic vesicle pool size. *Sci Rep* **7**, 42920
- Radyushkin K, Hammerschmidt K, Boretius S, Varoqueaux F, El-Kordi A, Ronnenberg A, Winter D, Frahm J, Fischer J, Brose N, Ehrenreich H (2009): Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav* **8**, 416–425
- Reissner C, Runkel F, Missler M (2013): Neurexins. *Genome Biol* **14**, 213
- Riemann D, Petkova A, Dresbach T, Wallrafen R (2018): An Optical Assay for Synaptic Vesicle Recycling in Cultured Neurons Overexpressing Presynaptic Proteins. *J Vis Exp*

- Rizzoli SO, Betz WJ (2005): Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6, 57–69
- Rubenstein JLR, Merzenich MM (2003): Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2, 255–267
- Rüegg UT, Hefti F (1984): Growth of dissociated neurons in culture dishes coated with synthetic polymeric amines. *Neurosci Lett* 49, 319–324
- Rui M, Qian J, Liu L, Cai Y, Lv H, Han J, Jia Z, Xie W (2017): The neuronal protein Neurexin directly interacts with the Scribble-Pix complex to stimulate F-actin assembly for synaptic vesicle clustering. *J Biol Chem* 292, 14334–14348
- Rust MB, Maritzen T (2015): Relevance of presynaptic actin dynamics for synapse function and mouse behavior. *Exp Cell Res* 335, 165–171
- Salinas PC, Zou Y (2008): Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 31, 339–358
- Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA (2003): Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci* 6, 127–135
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T (2000): Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657–669
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA (2002): Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13902–13907
- Serra-Pagès C, Kedersha NL, Fazikas L, Medley Q, Debant A, Streuli M (1995): The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *EMBO J* 14, 2827–2838
- Sheng M, Kim E (2011): The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Shipman SL, Nicoll RA (2012): Dimerization of postsynaptic neuroligin drives synaptic assembly via transsynaptic clustering of neurexin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19432–19437
- Sholl DA (1953): Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87, 387–406
- Song HJ, Ming GL, Poo MM (1997): cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275–279
- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999): Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1100–1105

- Soykan T, Schneeberger D, Tria G, Buechner C, Bader N, Svergun D, Tessmer I, Pouloupoulos A, Papadopoulos T, Varoqueaux F, et al. (2014): A conformational switch in collybistin determines the differentiation of inhibitory postsynapses. *EMBO J* **33**, 2113–2133
- Südhof TC (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509–547
- Südhof TC (2012): The presynaptic active zone. *Neuron* **75**, 11–25
- Südhof TC (2018): Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron* **100**, 276–293
- Südhof TC, Rizo J (1996): Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* **17**, 379–388
- Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, Hirabayashi S, Ohno K, Peles E, Hata Y (2007): Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* **100**, 154–166
- Sun C, Cheng M-C, Qin R, Liao D-L, Chen T-T, Koong F-J, Chen G, Chen C-H (2011): Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* **20**, 3042–3051
- Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC (2007): A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* **318**, 71–76
- Tan Z-J, Peng Y, Song H-L, Zheng J-J, Yu X (2010): N-cadherin-dependent neuron-neuron interaction is required for the maintenance of activity-induced dendrite growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9873–9878
- tom Dieck S, Sanmartí-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kämpf U, Fränzer JT, et al. (1998): Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* **142**, 499–509
- Trobiani L, Meringolo M, Diamanti T, Bourne Y, Marchot P, Martella G, Dini L, Pisani A, De Jaco A, Bonsi P (2020): The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Biobehav Rev* **119**, 37–51
- Varoqueaux F, Jamain S, Brose N (2004): Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol* **83**, 449–456
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Südhof TC, Brose N (2006): Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* **51**, 741–754
- Vaughn JE (1989): Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse* **3**, 255–285
- Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW (1999): Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *J Cell Biol* **147**, 151–162

- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC (1997): Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388, 593–598
- Wang Y, Sugita S, Südhof TC (2000): The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem* 275, 20033–20044
- Wang Y, Liu X, Biederer T, Südhof TC (2002): A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14464–14469
- Wittenmayer N, Körber C, Liu H, Kremer T, Varoqueaux F, Chapman ER, Brose N, Künner T, Dresbach T (2009): Postsynaptic Neuroligin1 regulates presynaptic maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13564–13569
- Xu Jing, Du Y-L, Xu J-W, Hu X-G, Gu L-F, Li X-M, Hu P-H, Liao T-L, Xia Q-Q, Sun Q, et al. (2019): Neuroligin 3 Regulates Dendritic Outgrowth by Modulating Akt/mTOR Signaling. *Front Cell Neurosci* 13, 518
- Xu X, Xiong Z, Zhang L, Liu Y, Lu L, Peng Y, Guo H, Zhao J, Xia K, Hu Z (2014): Variations analysis of NLGN3 and NLGN4X gene in Chinese autism patients. *Mol Biol Rep* 41, 4133–4140
- Yamagata M, Duan X, Sanes JR (2018): Cadherins Interact With Synaptic Organizers to Promote Synaptic Differentiation. *Front Mol Neurosci* 11, 142
- Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, Schmitz-Abe K, Harmin DA, Adli M, Malik AN, et al. (2013): Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* 77, 259–273
- Zagrebelsky M, Korte M (2014): Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 628–638
- Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, Tavitian A (1989): The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J Biol Chem* 264, 12394–12401
- Zhang C, Milunsky JM, Newton S, Ko J, Zhao G, Maher TA, Tager-Flusberg H, Bolliger MF, Carter AS, Boucard AA, et al. (2009): A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *J Neurosci* 29, 10843–10854
- Zhang W, Benson DL (2001): Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21, 5169–5181
- Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo MM (1994): Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368, 140–144

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. rer. nat. T. Dresbach für die freundliche Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas, der herausragenden wissenschaftlichen Betreuung und der ständigen Erreichbarkeit.

Zudem möchte ich Frau A. Petkova für die geduldige praktische Betreuung im Zuge der Laborarbeit und der Datenauswertung herzlich danken.

Frau L. M. Hartmund und Frau N. Dankenbrink-Werder danke ich für die stets kollegiale Unterstützung bei der Vorbereitung der Experimente im Labor.