

**Die Rolle von Syndapin III für die Entwicklung und
synaptische Konnektivität des zerebralen Kortex**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Clarissa Hosse

geboren am 18.12.1993 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Britta Qualmann,
Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Knut Holthoff,
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Steffen Rosahl,
Klinik für Neurochirurgie, Helios Erfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. Dezember 2018

Die Ärztliche Prüfung wurde am 12. Juni 2019 in Jena bestanden.

1 INHALTSVERZEICHNIS

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS - 1 -

3 ZUSAMMENFASSUNG..... - 4 -

4 EINLEITUNG - 6 -

4.1 DER NEOKORTEX HÖHER ENTWICKELTER ORGANISMEN - 6 -

4.1.1 KORTIKALE HÖHERE FUNKTIONEN..... - 6 -

4.1.2 DER AUFBAU DES NEOKORTEX..... - 7 -

4.1.3 DIE EMBRYONALE ENTWICKLUNG DES NEOKORTEX VON SÄUGETIEREN - 9 -

4.1.4 DIE ROLLE VON AKTIN IN DER NEUROMORPHOGENESE..... - 13 -

4.2 DENDRITISCHE DORNFORTSÄTZE IN DER SYNAPTISCHEN ÜBERTRAGUNG - 15 -

4.2.1 STRUKTUR UND FUNKTION DENDRITISCHER DORNFORTSÄTZE - 15 -

4.2.2 DENDRITISCHE DORNFORTSÄTZE ALS FUNKTIONELLES KOMPARTIMENT - 16 -

4.2.3 FORMIERUNG DENDRITISCHER DORNEN UND SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT - 17 -

4.3 DIE PROTEINE DER SYNDAPIN-FAMILIE - 19 -

4.3.1 EXPRESSION UND STRUKTUR - 19 -

4.3.2 DIE INTERAKTIONSPARTNER DER SYNDAPINE..... - 20 -

4.3.3 FUNKTIONEN VON SYNDAPIN III - 22 -

4.4 KLINISCHE ASPEKTE - 24 -

5 ZIELE DER ARBEIT - 27 -

6 METHODIK..... - 28 -

6.1 MATERIAL - 28 -

6.1.1 MAUSLINIEN..... - 28 -

6.1.2 CHEMIKALIEN UND LABORREAGENZIEN - 28 -

6.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN - 28 -

6.1.4 ANTIKÖRPER..... - 29 -

6.1.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN - 31 -

6.1.6 GERÄTE UND *SOFTWARE* - 31 -

6.2 HISTOCHEMISCHE METHODEN	- 32 -
6.2.1 FÄRBUNG NACH CAMILLO GOLGI	- 32 -
6.2.2 NISSL-FÄRBUNG UND IMMUNFLUORESCENTE FÄRBUNG	- 34 -
6.3 MIKROSKOPIE UND BILDANALYSE	- 36 -
6.3.1 HELLFELDMIKROSKOPIE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG NISSL-GEFÄRBTER GEHIRNSCHNITTE UNTER ZUHILFENAHME VON IMAGEJ.....	- 36 -
6.3.2 KONFOKALE MIKROSKOPIE UND QUANTITATIVE ANALYSE FLUORESCENZMARKIERTER NERVENZELLEN UNTER VERWENDUNG VON IMAGEJ.....	- 37 -
6.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG MIT GRAPHPAD PRISM 8.0	- 38 -
<u>7 ERGEBNISSE</u>	- 39 -
7.1 AUSWIRKUNGEN DER SYNDAPIN III DEFIZIENZ AUF DIE DENDRITISCHEN DORNFORTSÄTZE IM ADULTEN MURINEN KORTEX	- 39 -
7.1.1 VERÄNDERUNGEN VON DICHTEN UND MORPHOLOGISCHER KLASSENVERTEILUNG VON DENDRITISCHEN DORNFORTSÄTZEN BEI SYNDAPIN III DEFIZIENZ.....	- 39 -
7.1.2 ANALYSE DER DORNENMORPHOLOGIE DENDRITISCHER DORNFORTSÄTZE IM MURINEN NEOKORTEX VON WT UND SYNDAPIN III KO MÄUSEN	- 44 -
7.2 AUSWIRKUNGEN DER SYNDAPIN III DEFIZIENZ AUF DIE MURINE KORTIKALE EMBRYONALENTWICKLUNG	- 49 -
7.2.1 ANALYSE DER EMBRYONALEN KORTIKALEN ORGANISATION IM VERGLEICH BEIDER GENOTYPEN	- 49 -
7.2.2 ANALYSE DER DICHTEN KORTIKALER NEURONE EMBRYONALER WT UND SYNDAPIN III KO MÄUSE	- 50 -
<u>8 DISKUSSION</u>	- 62 -
8.1 SYNDAPIN III BEEINFLUSST DIE KOMPLEXE ARCHITEKTUR DES ZEREBRALEN KORTEX UND SOMIT DIE SYNAPTISCHE KONNEKTIVITÄT	- 62 -
8.1.1 DIE SYNDAPIN III DEFIZIENZ FÜHRT ZU VERÄNDERUNGEN DER DICHTEN UND KLASSENVERTEILUNG DENDRITISCHER DORNFORTSÄTZE	- 62 -
8.1.2 SYNDAPIN III KO MÄUSE BESITZEN IM VERGLEICH ZU WT EINE UNREIFERE DORNENGESTALT	- 65 -
8.1.3 DIE PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ VON SYNDAPIN III IM KORTEX	- 67 -
8.2 DER EINFLUSS VON SYNDAPIN III AUF DIE EMBRYONALE ENTWICKLUNG DES KORTEX	- 72 -
8.2.1 DIE AUSWIRKUNGEN DER SYNDAPIN III DEFIZIENZ AUF DIE ORGANISATION DES KORTEX UND AUF EMBRYONALE VORLÄUFERZELLEN	- 72 -
8.2.2 DER EINFLUSS VON SYNDAPIN III AUF EMBRYONALE NERVENZELLEN DES KORTEX.....	- 76 -
<u>9 SCHLUSSFOLGERUNGEN</u>	- 84 -

10 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	- 86 -
11 ANHANG.....	- 106 -
11.1 ZUSÄTZLICHES MATERIAL.....	- 106 -
11.1.1 BILDMATERIAL	- 106 -
11.1.2 TABELLEN	- 108 -
11.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	- 109 -
11.3 TABELLENVERZEICHNIS	- 110 -
11.4 STATISTISCHE DATEN	- 111 -
11.5 DANKSAGUNG	- 119 -
11.6 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	- 121 -

2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
+	positiv
Abb.	Abbildung(en)
Abp1	Aktin-bindendes Protein 1
AD	(<i>alzheimer's disease</i>) Alzheimer
AF	Alexa Fluor®
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ARP3C	Aktin-ähnliches Protein (<i>actin-related protein</i>) 3 Homolog C
Arp2/3	Aktin-ähnliches Protein (<i>actin-related protein</i>) 2/3
AS	Aminosäure
ASD	Autismus-Spektrum-Störungen
Brn2	<i>brain2-gene product</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cobl	Cordon-Bleu
Ctip2	<i>COUP-TF-interacting protein 2</i>
Cux1	<i>cut-like homeobox 1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
E	Embryonaltag
EFC	<i>extended FCH</i> (Fes/CIP4 Homologie)
EHD	Eps15-Homologie-Domäne
F-Aktin	filamentöses Aktin
F-BAR	Fes/CIP4-Homologie-Bin/Amphiphysin/Rvs
FasL	Fas-Ligand
FBP17	Formin-bindendes Protein 17
FoxP2	<i>forkhead-box-protein 2</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
G-Aktin	monomeres Aktin

h	Stunde
KO	<i>knockout</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
mM	Millimolar (millimol/l)
MP	<i>Molecular Probes</i> [®]
min	Minute(n)
MIP	maximale Intensitätsprojektion
ml	Milliliter
MOM	<i>mouse on mouse</i>
MW	Mittelwert
N-WASP	Neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
n-Wert	Stichprobenanzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
NR3A	NMDA-Rezeptor-Untereinheit 3A
O.C.T	<i>optimum cutting temperature</i>
PACSIN	<i>protein kinase Ca and casein kinase 2 substrate in neurons</i>
PBS	(<i>phosphate-buffered saline</i>) Phosphat-gepufferte Kochsalz- lösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
ProSAP	Prolin-reiches Synapsen-assoziiertes Protein
PSD	postsynaptische Dichte
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Shank	SH3-Domänen/Ankyrin-Wiederholung-beinhaltendes Protein
SH3	Src-Homologie 3
Sox2	<i>SRY (sex determining region)-box 2</i>

Syndapin	<i>(synaptic, dynamin-associated protein)</i> synaptisches Dynamin-assoziiertes Protein
TBR2	<i>t-box brain protein 2</i>
TRPV4	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V mem- ber 4</i>
u.a.	unter anderem
UKJ	Universitätsklinikum Jena
ÜN	über Nacht
v.a.	vor allem
v/v	<i>(volume per volume)</i> Volumenprozent
w/v	<i>(weight per volume)</i> Gewichtprozent
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WRP	<i>WASP Verprolin-homologous protein-associated Rac GTPase-activating protein</i>
WT	Wildtyp
x	facher
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µm	Mikrometer

3 Zusammenfassung

Die Analyse von Proteinen, die im Zentralnervensystem (ZNS) essenziell an der Ausbildung neuronaler Netzwerke beteiligt sind, stellt das Fundament für das Verständnis von komplexem Verhalten, wie beispielsweise sozialer Interaktion, dar. Für die Familie der synaptischen Dynamin-assoziierten Proteine (Syndapine) wurde gezeigt, dass sie als Adapterproteine an neuronalen morphologischen Veränderungen und Membrantransportvorgängen entscheidend beteiligt und durch ihre Rolle in endozytotischen Prozessen sowie durch zahlreiche Proteininteraktionen wichtig für akkurate Rezeptorintegrität sowie für Modulierungen des Aktinzytoskeletts sind. Syndapin III *knockout* (KO) Mäuse zeigten einen distinkten Verhaltensphänotyp, der sich in einem abweichendem Nestbauverhalten sowie gestörter sozialer Interaktion manifestierte. Zusätzlich wurde im Kortex der Syndapin III KO Mäuse eine Verlängerung und eine Volumenzunahme des Dendritenbaumes von Schicht II/III- und Schicht V-Pyramidenzellen im Vergleich zu Wildtypen (WT) detektiert. Ziel der Arbeit war es, wesentliche Einblicke in potenzielle Mechanismen, die zur Ausprägung des Phänotyps im Sozialverhalten im adulten Syndapin III KO Tier führen könnten, zu gewinnen. Dafür wurde die komplexe Architektur des zerebralen Kortex mit Fokus auf dendritische Dornfortsätze sowie die embryonale Entwicklung untersucht.

Anhand Golgi-gefärbter muriner Gehirnschnitte wurden die Dendriten der Pyramidenzellen der Schichten II/III und V des Neokortex im Vergleich der Genotypen analysiert. Es ließ sich erstmalig ein postsynaptischer Einfluss von Syndapin III nachweisen, da eine erheblich verringerte Dichte von kopfhaltigen dendritischen Dornfortsätzen im Syndapin III KO im Vergleich zu WT detektiert wurde. Des Weiteren war im Syndapin III KO verglichen mit WT insbesondere die unreifere, filopodienähnliche Dornenklasse verhältnismäßig überrepräsentiert, während auch die anderen Dornenklassen eine anteilige Verschiebung verzeichneten. Ferner zeigten Untersuchungen der Dornenmorphologie im Syndapin III KO verglichen mit WT Veränderungen insbesondere pilzförmiger und dünner Dornenklassen der kortikalen Schicht II/III sowie eine Elongation aller Dornenklassen dieser Schicht und pilzförmiger sowie filopodienähnlicher Dornen der kortikalen Schicht V. Die beobachteten Effekte deuteten in Zusammenhang mit den Veränderungen des Dendritenbaumes auf eine abweichende räumliche Organisation des Neokortex im Syndapin III KO verglichen mit WT hin und zeigten Ähnlichkeiten zu beobachteten Veränderungen dendritischer Dornfortsätze bei pathophysiologischen Prozessen und neurologischen Erkrankungen.

gen. Die Ergebnisse der Analysen in adulten WT und Syndapin III KO Mäusen führten weiterhin zu der Annahme, dass Syndapin III eine Rolle in Bildungs- und Reifungsprozessen dendritischer Dornen einnimmt und bilden die Grundlage für zukünftige Untersuchungen funktioneller Abweichungen mit putativ resultierender Störung in der synaptischen Transmission bei Syndapin III Defizienz.

In weiteren Experimenten wurde die Konstitution des zerebralen Kortex mittels Nissl-Färbung zu embryonalen Zeitpunkten im Vergleich der Genotypen untersucht. Die Kortikale Platte ließ eine, bezogen auf die Kortikale Wand, transiente Verdickung zum Embryonaltag (E)14,5 sowie eine gegenläufige verminderte relative Ausdehnung zum Zeitpunkt E18,5 im Syndapin III KO verglichen mit WT und somit pränatale Abweichungen in der strukturellen Organisation des Kortex bei Syndapin III Defizienz verzeichnen. Ferner deckten kortikale immunfluoreszente Analysen konträre Veränderungen der Dichte Neuronen-generierender *t-box brain protein 2* (Tbr2)-positiver neuronaler Vorläuferzellen zu beiden untersuchten Zeitpunkten im Vergleich der Genotypen auf. Es zeigte sich zum Tag E14,5 eine Verminderung und zum Tag E18,5 eine Erhöhung der Dichte Tbr2-positiv-gefärbter Zellen im Syndapin III KO verglichen mit WT. Zum Zeitpunkt E18,5 war überdies die Dichte *SRY (sex determining region)-box 2* (Sox2)-positiver Radialgliazellen im Syndapin III KO im Vergleich zum WT gesteigert. Ergänzende Untersuchungen mittels kortikaler Schichtenmarker akzentuierten eine erhöhte Dichte von Nervenzellen tiefer Schichten zum Tag E14,5 mit darauffolgender konträrer Verringerung zum Zeitpunkt E18,5 in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT. Die Dichte der *brain2-gene product* (Brn2) immunfluoreszent markierten Zellen, welche vorwiegend Neurone der Schicht II/III repräsentieren, zeigte hingegen eine transiente Verminderung zum Tag E14,5 sowie eine Erhöhung zum Zeitpunkt E18,5 im Syndapin III KO im Vergleich zum WT. Folglich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig unbekannte Abweichungen in der Embryonalentwicklung bei Syndapin III Defizienz aufgedeckt und ein Einfluss von Syndapin III auf die Ausbildung neuronaler Progenitorzellen mit konsekutiver Auswirkung auf die Neuronenanzahl vermutet.

Anhand dieser Ergebnisse wurden bis dato unbekannte kortikale Auswirkungen bei Syndapin III Defizienz zu verschiedenen Alterszeitpunkten detektiert, die den adulten Verhaltensphänotypen der Syndapin III KO Mäuse potenziell begründen könnten. Zusammenfassend wurde für Syndapin III eine essenzielle neuronale Bedeutung

nachgewiesen, die sich sowohl in embryonalen Entwicklungsprozessen des Kortex als auch langfristig in der kortikalen synaptischen Verknüpfung widerspiegeln.

4 Einleitung

4.1 Der Neokortex höher entwickelter Organismen

4.1.1 Kortikale höhere Funktionen

Die Fähigkeit zur sozialen Interaktion mit Artgenossen stellt die Grundlage für innerartliche Kommunikation dar und ist für nahezu alle Organismen überlebenswichtig (Adolphs 1999, Frith und Frith 2007). Von elementarer Bedeutung für ein adäquates Sozialverhalten sind zerebrale Denk-, Lern- und Gedächtnisprozesse. Der Neokortex gewährleistet höhere mentale und kognitive Funktionen und stellt somit die Grundlage für solch komplexe Informationsprozessierungen in Säugetieren dar (Monuki und Walsh 2001). Die Konstituierung präziser kortikaler Netzwerke sowie ihre Bildung, Reifung und Modulierung unterliegt einer Vielzahl zeitlich und räumlich kontrollierter Prozesse (da Silva und Dotti 2002). Während im embryonalen Lebensabschnitt zunächst die Neurogenese und somit die Anlage von Gehirnstrukturen, einschließlich der Entstehung von Nervenzellen und des Neokortex stattfindet, überwiegt in den darauffolgenden Lebensabschnitten die neuronale Plastizität (Molyneaux et al. 2007, Holtmaat und Svoboda 2009). Neuronale Plastizität beschreibt den individuellen bedarfsabhängigen Umbau einzelner Nervenzellen und ihrer Verbindungen sowie ganzer Hirnareale, um Funktionen des ZNS zu erhalten, anzupassen oder zu erweitern (Sporns 2011). Gehirnentwicklung, synaptische Transmission sowie neuronale Plastizität benötigen beträchtliche Membranzumformungsprozesse und ein profundes Repertoire synaptischer Proteine. Für die strukturelle synaptische Plastizität ist eine korrekte Induktion, Reifung und Adaptation synaptischer Verbindungen und somit die Modulation des Dendritenbaumes und axonaler Verknüpfungen wesentlich. Ferner ist die funktionelle synaptische Plastizität, welche die quantitative Transmitterfreisetzung moduliert von korrekter Exozytose, Endozytose und Vesikelrezyklierungsprozessen abhängig und gemeinsam mit der strukturellen Plastizität für die kortikale Plastizität essenziell (Anggono et al. 2006, Gordon-Weeks und Fournier 2014). Eine korrekte Morphologie und Konnektivität diverser neuronaler Netzwerke ist die Voraussetzung für angemessenes Sozialverhalten und daher für die Aufschlüsselung abweichender Verhaltensweisen von besonderem Interesse (Klüver und Bucy 1997, Frith 2007). Die pränatale Anlage und die darauffolgende lebenslange Reifung und

Remodulierung zerebraler Strukturen sind die wesentlichen Prozesse für besagte kortikale Netzwerke und bedürfen jederzeit einer präzisen Regulation. Bereits transiente Abweichungen zu distinkten Zeitpunkten können erhebliche neuronale Störungen in jeglichen Lebensphasen initiieren. Somit existieren kritische vulnerable Phasen während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems, die sich erst adult manifestieren und Erkrankungen wie Schizophrenie bedingen können (Rice und Barone 2000). Sowohl adulte als auch embryonale kortikale Netzwerke müssen für ein grundlegendes Verständnis der elementaren Prozesse zur Aufdeckung von Ursachen abweichender zerebraler Abläufe analysiert werden. Daher ist neben der kortikalen Embryonalentwicklung mit Fokus auf die für Differenzierung von Vorläuferzellen und Entstehung von Nervenzellen kritischen Neurogenese die postnatale Reifung dieser Strukturen mit ihren dynamischen synaptischen Verbindungen von besonderem Interesse.

4.1.2 Der Aufbau des Neokortex

Gehirn und Rückenmark bilden das ZNS, welches gemeinsam mit dem peripheren Nervensystem die Aufrechterhaltung jeglicher Körperfunktionen koordiniert (Trepel 2015). Das Gehirn besteht aus einem hoch organisiertem Netzwerk von Nervenzellen, die über Synapsen miteinander verbunden und in Großhirn, Zwischenhirn, Mittelhirn, Kleinhirn und Hirnstamm untergliedert sind (Molyneaux et al. 2007, Hotulainen und Hoogenraad 2010, Trepel 2015). Das Großhirn lässt sich in den älteren Allokortex und den phylogenetisch jüngeren Neokortex unterteilen und stellt 85 Prozent (%) der Gehirnmasse dar (Trepel 2015). Es setzt sich aus dem primär aus Nervenfasern bestehendem Großhirnmark und der Rinde (Kortex) zusammen (Florio und Huttner 2014, Trepel 2015). Die Großhirnrinde ist die höchstentwickelte Struktur des Nervensystems und neben enormer Komplexität durch ein beträchtliches Ausmaß an Differenzierung und funktioneller Kompartimentierung mit distinkten Verbindungen (intrakortikal, subkortikal, subzerebral) gekennzeichnet (Rakic 1988, Rakic 2009). Der Kortex verarbeitet und differenziert eingehende Sinnesinformationen, koordiniert komplexe Verhaltensweisen und fungiert darüber hinaus als Informationsspeicher und somit Gedächtnis des Organismus (Trepel 2015). Für diese komplexen Prozesse bietet der hoch entwickelte Neokortex mit seiner charakteristischen zellulären Komposition, bestehend aus Neuronen und Gliazellen optimale Rahmenbedingungen (Finlay und Darlington 1995, Rudie et al. 2012). Während Gliazellen vielfältig-

ge stützende und modulierende Funktionen im neuronalen Stoffwechsel haben, sind Nervenzellen für die Weiterleitung von Informationen (Erregung oder Hemmung) zuständig (Marin und Rubenstein 2001, Trepel 2015). Funktionell unterscheidet man zwei Hauptklassen kortikaler Nervenzellen– inhibitorische γ -Aminobuttersäure (GABA)-erge Interneurone und exzitatorische glutamaterge Projektionsneurone, welche charakteristisch ihre Axone zu weit entfernten Zielen des ZNS entsenden (Molyneaux et al. 2007, Florio und Huttner 2014, Kwan et al. 2012). Zellen mit einer typischen pyramidenförmigen Morphologie und diversen Zellfortsätzen stellen den überwiegenden Anteil dieser Projektionsneurone dar (Molyneaux et al. 2007). Bei den Fortsätzen handelt es sich um ein basal vom Zellkörper abgehendes Axon und mehrere seitlich und apikal lokalisierte Dendriten. Diese Dendriten sind mit zahlreichen kleinen Ausstülpungen versehen, bei denen es sich um dendritische Dornfortsätze handelt. An diesen postsynaptischen Strukturen erhalten die Nervenzellen Informationen von präsynaptischen Endigungen der Axone anderer Neurone. Jede Nervenzelle kann dabei Verbindungen mit mehr als 1000 weiteren Neuronen eingehen (Stiles und Jernigan 2010). Die verschiedenen Nervenzellen sind im Neokortex horizontal und somit parallel zur Gehirnoberfläche angeordnet. Die außen lokalisierte Kortexschicht I beinhaltet vorrangig die Dendriten von Neuronen tieferer Schichten und nur wenige Zellen. Der Großteil der Pyramidenzellen ist in den Schichten II-VI mit besonderer Repräsentierung in den Schichten III und V lokalisiert (Kwan et al. 2012). Während in Schicht II einige kleine Pyramidenzellen mit ipsilateralen Efferenzen vorhanden sind, weist Schicht III größere Pyramidenzellen mit kontralateralen durch den Balken zu der gegenüberliegenden Hemisphäre verlaufender Efferenzen auf. Schicht II und III werden bei der Maus häufig zusammengefasst, da keine deutliche Grenze zwischen den Kortexschichten existiert. In Schicht IV sind Interneurone, exzitatorische Nicht-Pyramidenzellen und ein Großteil des Dendritenbaumes der Schicht III-Pyramidenzellen, die Afferenzen aus der Körperperipherie erhalten und in die Kortexschichten I-III weiterleiten, lokalisiert. Die Schicht V imponiert durch ihre großen Pyramidenzellen, die den Hauptanteil der kortikalen subzerebralen Efferenzen bildet und Fortsätze bis ins Rückenmark entsenden kann (Terashima 1995). Sowohl Interneurone als auch kortikothalamische Projektionsneurone sind in der Schicht VI lokalisiert (Trepel 2015).

Ergänzend zu der beschriebenen radiären Organisation existiert zusätzlich eine neokortikale Gliederung in vertikale Einheiten. Diese senkrechten Säulen werden auch

als Kolumnen bezeichnet und erstrecken sich über alle sechs Kortexschichten (Mione et al. 1994). Sie stellen strukturelle und funktionelle Einheiten mit einer Vielzahl von Neuronen dar, die untereinander stark vernetzt sind und durch hemmende Interneurone vom benachbarten Gewebe funktionell abgegrenzt werden. Diese Kolumnen sind die kleinsten Funktionseinheiten des Kortex und fundamental an seiner Kompartimentierung in gegliederte Gebiete mit distinkten Verbindungen (intrakortikal, subkortikal und subzerebral) beteiligt (Mountcastle 1997).

4.1.3 Die embryonale Entwicklung des Neokortex von Säugetieren

Die Kortikogenese in Mäusen verläuft von E11 bis zu E19 (Angevine und Sidman 1961, Dehay und Kennedy 2007, Molyneaux et al. 2007) (Abbildung (Abb.) 1A, B). Bereits ab Tag E7,5 bildet sich die Neuralplatte, eine Schicht epithelialer Zellen, aus und stellt den initialen Ursprung einer Gehirnentwicklung in der Maus dar. Die Neuralplatte transformiert sich darauffolgend mittels Zell-Adhäsion-sowie Zell-Kommunikation-regulierter Prozesse in das aus Neuroepithel bestehende Neuralrohr. Dieses Neuroepithel grenzt sich vom umliegenden Gewebe basal durch eine Basalmembran und auf der apikalen Seite durch Adhärenz-Verbindungen (*Adherens Junctions*) ab (Junghans et al. 2005). Bei diesen Adhärenz-Verbindungen handelt es sich um die Verknüpfung von Aktinfilamenten benachbarter Zellen, in denen Cadherine (Calcium-abhängige Transmembranproteine) mit diversen Ankerproteinen, wie unter anderem (u.a.) β -Catenin, mit dem Aktinzytoskelett gekoppelt sind. Am Tag E8,5 kommt es zur Ausbildung von drei Ausbuchtungen am vorderen Ende des Neuralrohrs (Kaufman 1999). Aus diesen sogenannten Hirnbläschen werden die drei elementaren Hirnareale: Vorderhirn (Anlage für Großhirn und Zwischenhirn) (Abb. 1C), Mittelhirn und Rautenhirn (Anlage für Brücke, Kleinhirn und verlängertes Mark). Die Vorläuferzellen der kortikalen Nervenzellen unterscheiden sich in ihrem Ursprung innerhalb des embryonalen Vorderhirns (Marin und Rubenstein 2001). Die Projektionsneurone und der Großteil der Gliazellen entstammen der Rückwand des Vorderhirns (Anderson et al. 2002, Molyneaux et al. 2007). Inhibitorische Interneurone entstehen hingegen aus Vorläuferzellen der Vorwand (Marin und Rubenstein 2001, Wonders und Anderson 2006). Von den verschiedenen Ursprüngen ausgehend migrieren die Nervenzellen zu ihrer determinierten Lokalisation im Kortex (Marin und Rubenstein 2001). Es existieren mindestens drei grundlegende Arten neuronaler Vorläuferzellen: neuroepitheliale Gliazellen, Radialgliazellen und Intermediärgliazel-

len (Götz und Huttner 2005, Molyneaux et al. 2007, Dehay und Kennedy 2007). Beschrieben werden insbesondere zwei neurogene Zonen, die den Hirnventrikeln anliegende Ventrikularzone und die apikalere Subventrikularzone (Rakic 2009). Initial ist das Neuroepithel der Ventrikularzone mittels der neuroepithelialen Gliazellen vorherrschend aktiv und generiert durch zahlreiche Zellteilung ein Reservoir multipotenter Vorläuferzellen und zu einem geringen Anteil die ersten Nervenzellen (Dehay und Kennedy 2007, Florio und Huttner 2014). Mit fortschreitender Kortikogenese entstehen bei diesen Teilungen vorwiegend Radialgliazellen. Die Radialglia der Ventrikularzone sind für die ordnungsgemäße Wanderung der Neuronen zu ihren finalen Positionen von fundamentaler Bedeutung (Marin und Rubenstein 2001). Neben der adäquaten Führung der Vorläuferzellen fungieren einige Radialgliazellen auch als direkte Vorläufer neuer pyramidalen Neurone oder als Produzenten von den intermediären Gliazellen; diese Vorläuferzellen sind in der Subventrikularzone und der basalen Ventrikularzone lokalisiert (Hartfuss et al. 2001, Molyneaux et al. 2007, Nadarajah und Parnavelas 2002). In der späteren Embryonalentwicklung sowie postnatal fungieren die radialen Gliazellen als Vorläuferzellen für Oligodendrozyten und Astrozyten (Florio und Huttner 2014). Die ersten Neurone erscheinen am 11. embryonalen Tag der Maus und formen die Präplatte (Abb. 1D), welche sich später in die apikal lokalisierte Marginalzone als embryonale Anlage für die Kortexschicht I und die basal gelegene Subplatte aufteilt (Abb. 1A, Abschnitt E12,5) (Marín-Padilla 1978, Dehay und Kennedy 2007). Die Subplatte wird von der Subventrikularzone durch eine zellarme Schicht von Nervenfasern, welche als Intermediärzone bezeichnet wird und im adulten Gehirn die weiße Substanz repräsentiert, separiert (Kwan et al. 2012). In kurzer Zeit entsteht durch Migration von Vorläuferzellen und post-mitotischer, nicht mehr zur Zellteilung fähiger, Neurone entlang von Vorläuferzellen zwischen der Marginalzone und der Subplatte die Kortikale Platte, welche die Anlage für die Schichten II bis VI des adulten Kortex darstellt (Abb. 1E) (Marín-Padilla 1978, Kwan et al. 2012). Die Kortikale Platte besteht zunächst aus unreifen bzw. undifferenzierten bipolaren Zellen, die Vorläufer aller kortikaler Neurone und aller Schichten des zukünftigen zerebralen Kortex darstellen (Marín-Padilla 1978). Während der fortschreitenden Kortikogenese migrieren weitere Neurone in die Kortikale Platte, indem sie sich von innen nach außen anlagern (*inside-out layering*) (Abb. 1A, Abschnitt E14,5) (Angevine und Sidman 1961, Rakic 2009, Molyneaux et al. 2007, Kwan et al. 2012). Die Reifung der Neurone der Kortikalen Platte beginnt in den tieferen kortikalen

Schichten, welche sich somit als Teil der Kortikalen Platte zuerst ausbilden. Im Verlauf der Embryonalentwicklung schreitet die Ausbildung der Kortikalen Platte in den zukünftigen höheren kortikalen Schichten fort.

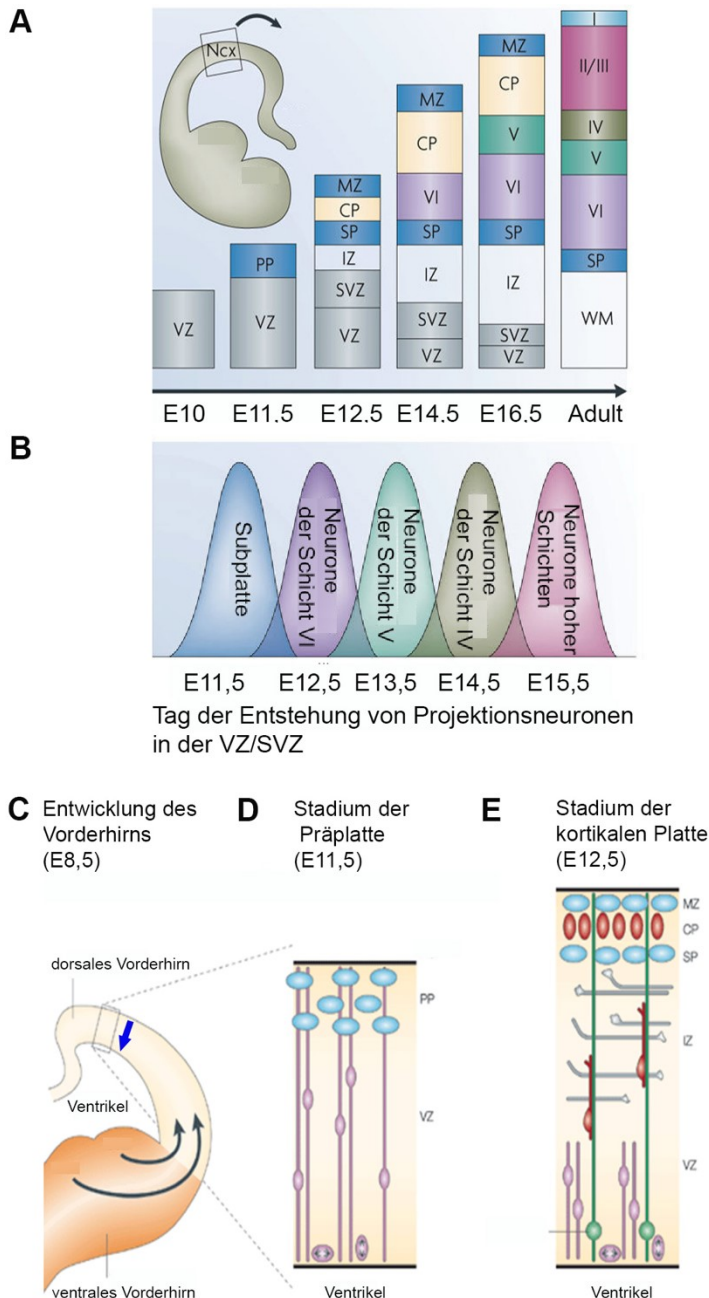


Abb. 1: Die pränatale murine Gehirnentwicklung. (A,B) Die schematische Darstellung der Entstehung der laminaren Organisation des Neokortex (Ncx) verdeutlicht das *inside-out layering* der Vorläuferzellen. (B) Diverse Vorläuferzellen verschiedener Neurone werden in überlappenden zeitlichen Abschnitten gebildet. VZ: Ventrikularzone, PP: Präplatte, SVZ: Subventrikularzone, IZ: Intermediärzone, SP: Subplatte, CP: Kortikale Platte, MZ: Marginalzone, I-VI: jeweilige kortikale Schicht, WM: Weiße Substanz. Die beschrifteten Schichten I-VI gehören auch zur CP, werden jedoch zur besseren Veranschaulichung in der Abb. extra aufgeführt, sobald die Migration der Neurone der betreffenden kortikalen Schicht abgeschlossen ist. Modifiziert nach Molyneux et al. (2007). (C) Schematische Darstellung des sich entwickelnden Vorderhirns mit Ursprung der verschiedenen Nervenzellen. Die Rückwand des Vorderhirns ist der Ursprung für Projektionsneurone und einen Großteil der Gliazellen (blauer Pfeil visualisiert bevorzugte Migrationswege der Gliazellen), die Vorderwand stellt die Anlage für die Interneurone (schwarze Pfeile visualisieren bevorzugte Migrationswege der Interneurone) dar. (D,E) Verschiedene Stadien der neokortikalen Entwicklung in dem Bereich des in (C) gekennzeichneten rechteckigen Kortexausschnittes. (D) Die neuronale Migration beginnt, wenn die ersten post-mitotischen Neurone die Ventrikularzone (VZ) verlassen und die Präplatte (PP) bilden. (E) Die Neurone migrieren mit Hilfe der Gliazellen durch die Intermediärzone (IZ), um die PP in eine äußere Marginalzone (MZ) und eine innere Subplatte (SP) zu spalten und die kortikale Platte (CP) zu bilden. Modifiziert nach Nadarajah und Parnavelas (2002).

Demnach entstehen die Neurone der tieferen Schichten V und VI früher als die Nervenzellen der oberflächlichen Kortexschichten II bis IV (Greig et al. 2013, Molyneaux et al. 2007). Angesiedelt in der basalen Ventrikularzone und der Subventrikularzone stellen die intermediären Vorläuferzellen die andere Hauptklasse Neuronenproduzierender Zellen dar (Noctor et al. 2004). Während die Nervenzellen zu Beginn der Neurogenese überwiegend den Vorläuferzellen der Ventrikularzone entspringen, besitzen Neurone ab dem 14. embryonalen Tag ihren Ursprung weitgehend in der Subventrikularzone (Molyneaux et al. 2007). Da zunächst die Neurone der tieferen Kortexschichten und darauffolgend die Neurone der oberflächlichen Schichten gebildet werden, stellt die Subventrikularzone den wesentlichen Ausgangspunkt der Neurogenese für Nervenzellen höherer Schichten dar (Caviness 1982, Dehay und Kennedy 2007). Studien des Neokortex von Säugetieren belegen, dass Neurone höherer Schichten bezogen auf die Evolution erst kürzlich entstanden sind, indes Projektionsneurone aus Schicht V und VI bereits im primitiven Kortex vorhanden waren (Marín-Padilla 1992, Molyneaux et al. 2007).

Die Neurogenese ist ein hochspezifischer Prozess, dessen chronologischer Ablauf und strukturelle Organisation durch extrinsische und intrinsische Signale, wie zum Beispiel (z.B.) Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Monuki und Walsh 2001, Hevner et al. 2006, Mallamaci und Stoykova 2006, Guillemot 2007, O'Leary und Sahara 2008). In Anbetracht der Heterogenität der verschiedenen Vorläuferzellen und der Diversität in ihrem Ursprung in der Ventrikularzone und der Subventrikularzone müssen sowohl extrinsische als auch intrinsische Signale der Zelle exakt reguliert und aufeinander abgestimmt sein, um die korrekte Lokalisierung der späteren post-mitotischen Neurone zu gewährleisten (Sur und Leamey 2001, Miyashita-Lin et al. 1999, Rakic 1988, Monuki und Walsh 2001, Florio und Huttner 2014). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die mit der Erbinformation im Zellkern in Kontakt treten und dadurch genetische Programme an- oder abschalten können. Sie wurden bereits, beispielsweise in Abhängigkeit der Brn2-Gen Aktivierung, mit Migration von Nervenzellen assoziiert (Molyneaux et al. 2007, Dominguez et al. 2013).

4.1.4 Die Rolle von Aktin in der Neuromorphogenese

Während der embryonalen Neuromorphogenese finden umfangreiche Veränderungen der Zellmorphologie statt (Heng et al. 2010). Die Induktion und Gestaltung axonaler und dendritischer Architektur sind fundamentale Aspekte neuronaler Netzwerkformierung und Informationsprozessierungen des ZNS (Dharmalingam et al. 2009). Essenziell für die Ausbildung, Stabilisierung und adaptive Dynamik der Zellmorphologie ist das Zytoskelett (Conde und Cáceres 2009), ein aus Proteinen aufgebautes komplexes Netzwerk bestehend aus dynamischen Filamenten (Heng et al. 2010). Die Aktinfilamente, auch als Mikrofilamente bezeichnet, stellen gemeinsam mit den Intermediärfilamenten und Mikrotubuli die drei grundlegenden Elemente dieses zellulären Skeletts dar (Fletcher und Mullins 2010). In Zellen existiert Aktin in zwei möglichen Ausprägungen, neben dem monomeren (G-Aktin) gibt es das filamentöse (F-Aktin). F-Aktin stellt helikale Polymere aus G-Aktin dar, in dem zwei Ketten linksgängig umeinander gewunden sind (Holmes et al. 1990). Charakteristisch für diese fadenförmigen Zellstrukturen ist, dass sie sich abhängig von wechselnden Umgebungsbedingungen umgestalten und somit zelluläre dynamische Prozesse, wie z.B. die Neuromorphogenese, gewährleisten können (Lee und Dominguez 2010). Eine präzise koordinierte und lokalisierte Aktinfilamentformierung ist von elementarer Notwendigkeit für die embryonale Entwicklung von Nervenzellen (da Silva und Dotti 2002). Neurone induzieren abhängig von den divergierenden Anforderungen der Umgebung durch dynamische Modulationen des Aktinzytoskeletts protrusive Strukturen wie z.B. Neuriten, Verzweigungen der Neuriten und dendritische Dornen (Cingolani und Goda 2008, Witte und Bradke 2008, Heng et al. 2010). Grundlegend für solche Umwandlungen ist die Aktinpolymerisation, die durch zahlreiche Proteine eng reguliert wird (Foster et al. 1996, Lappalainen et al. 1998, Paunola et al. 2002, Goode und Eck 2007, Machesky et al. 1994, Pruyne et al. 2002, Ahuja et al. 2007, Lee und Dominguez 2010). Durch spezielle Aktinnukleationsfaktoren, wie z.B. dem Aktin-ähnlichen Protein 2/3 (Arp2/3)-Komplex, werden die Bildung von Aktinfilamenten und deren Verzweigungen gefördert (Machesky et al. 1994, Machesky und Insall 1999). Spezielle Aktin-bindende Proteine, wie beispielsweise Mitglieder der Wiskott-Aldrich Syndrom-Protein (WASP)-Familie oder das Protein Cordon-Bleu (Cobl) kontrollieren die regelrechte Aktinnukleation (Miki et al. 1996, Miki et al. 1998, Rohatgi et al. 1999, Ahuja et al. 2007).

Auch für synaptische Verbindungen ist ein komplex verzweigtes Netzwerk aus

Aktinfilamenten charakteristisch. Die Postsynapse exzitatorischer Synapsen ist durch die postsynaptische Dichte (PSD), eine elektronenmikroskopisch sichtbare Anhäufung von Proteinen, gekennzeichnet (De Robertis und Bennett 1955, Gray 1959, Palay 1956). Sie nimmt ungefähr zehn Prozent der Oberfläche des Dornfortsatzkopfes ein (Hering und Sheng 2001). Die PSD weist eine komplexe Matrix aus synaptischen Proteinen auf, welche zusammenarbeiten, um synaptische Organisation, Stabilität, Reifung und Transmission zu realisieren (Harris und Kater 1994). Dabei handelt es sich um für die neuronale Kommunikation essenzielle Neurotransmitterrezeptoren wie z.B. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren sowie zahlreiche Gerüstproteine einschließlich PSD-95, Prolin-reiches Synapsen-assoziiertes Protein (ProSAP) und Homer sowie Proteine zur Signaltransduktion (Kelly und Cotman 1978, Harris und Kater 1994, Bourne und Harris 2008). Unterhalb der PSD, lokalisiert in Dornfortsatzkopf und -hals, ist G-Aktin und F-Aktin in hoher Quantität präsent. F-Aktin bildet ein verzweigtes Netzwerk (Blomberg et al. 1977, Metzuzals und Mushynski 1974, Fifiková und Delay 1982). Während die Aktinfilamente des Dornfortsatzhalses in Längsrichtung verlaufen, sind sie im Dornfortsatzkopf gitterförmig organisiert und besitzen eine hohe Fluktuation mit kompletter Proteinsubstitution innerhalb weniger Minuten (min) (Honkurra 2008) (Abb. 2).

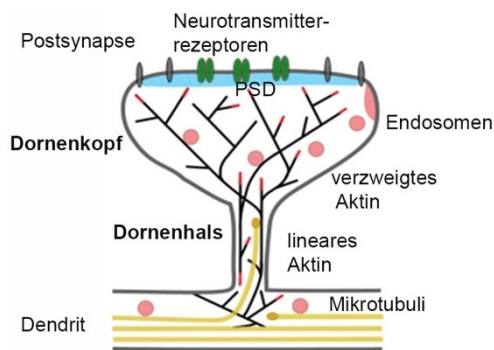


Abb. 2: Der Aufbau einer pilzförmigen Postsynapse. Schematische Darstellung einer Postsynapse anhand eines reifen pilzförmigen Dornfortsatzes. Gezeigt sind Neurotransmitterrezeptoren (grün und grau), die PSD (blau), Endosomen für Rezyklierungsprozesse (rosa), Aktinfilamente (schwarz) und Mikrotubuli (gelb). Modifiziert nach Hotulainen und Hoogenraad (2010).

Das Aktinnetzwerk wird durch verschiedene Signalwege moduliert (Bellot et al. 2014). Zahlreiche Aktin-bindende Proteine und andere Aktin-assoziierte-Proteine sind in dendritischen Dornfortsätzen angereichert und kooperieren, um Aktin-basierte zelluläre Prozesse zu regulieren (Star et al. 2002, Bellot et al. 2014). Nukleationspromotionsfaktoren, wie z.B. das Neuronale Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (N-WASP), können Aktinmonomere binden, mit dem Arp2/3-Komplex assoziieren und somit die Aktinnukleation von verzweigten Aktinfilamenten fördern (Higgs und Pollard 2000, Mullins et al. 1998, Goley und Welch 2006). Das Aktinzytoskelett in reifen

dendritischen Dornfortsätzen ist für die Gewährleistung der synaptischen Struktur, die Organisation der PSD und für die Stabilisierung postsynaptischer Rezeptoren essenziell (Sheng und Hoogenraad 2007, Hotulainen und Hoogenraad 2010) und folglich mit seinen Umbauprozessen maßgeblich für Gestalt, Größe, Mobilität und Stabilität dendritischer Dornen verantwortlich (Dunaevsky et al. 1999, Matus et al. 1982).

4.2 Dendritische Dornfortsätze in der synaptischen Übertragung

4.2.1 Struktur und Funktion dendritischer Dornfortsätze

Synapsen dienen der Informationsübertragung innerhalb kortikaler Netzwerke und ermöglichen somit die neuronale Kommunikation (Bliss und Lømo 1973, Adelsberger-Mangan und Levy 1993, Hotulainen und Hoogenraad 2010, Lei et al. 2016). Sie bestehen aus drei Elementen, der Präsynapse, dem synaptischen Spalt und der Postsynapse (De Robertis und Bennett 1955, Palay 1956). Dabei setzt die Präsynapse durch Calcium-Ionen-Erhöhung und Phosphorylierung von Vesikelproteinen Neurotransmitter aus Vesikeln frei (Gray 1959, Sudhof 2004). Die Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt und docken an spezialisierte, passende Rezeptoren der Postsynapse. Im Gehirn höher entwickelter Lebewesen sind die wichtigsten exzitatorischen Rezeptoren die glutamatergen und die wichtigsten inhibitorischen die GABA-ergen Rezeptoren. Ein Großteil der vor allem (v.a.) exzitatorischen Synapsen tragen ihr postsynaptisches Kompartiment auf dendritischen Dornfortsätzen (Crick 1982). Diese Dornen sind auf Dendriten lokalisierte Vorwölbungen neokortikaler und hippocampaler Pyramidenzellen, aber auch im Striatum und Purkinje-Zellen des Kleinhirns anzufinden (Gray 1959, Harris und Kater 1994, Hering und Sheng 2001, Bellot et al. 2014). Physiologisch wird eine Dichte zwischen einen und zehn Dornen pro Mikrometer (μm) Dendritenlänge beschrieben (Hering und Sheng 2001). Einzelne Dornen können zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Gestalten und Formen annehmen (Crick 1982, Dunaevsky et al. 1999, Bourne und Harris 2008). Basierend auf statischen Bildern erfolgt eine Klassifizierung, die das morphologische Repertoire der dendritischen Dornen in stummelförmige, dünne, pilzförmige und filopodienähnliche Dornfortsätze unterteilt (Peters und Kaiserman-Abramof 1970, Chang und Greenough 1984, Harris et al. 1992, Parajuli et al. 2017) (Abb. 3).

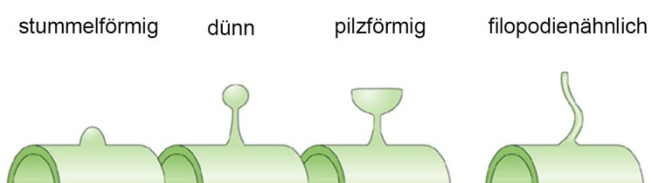


Abb. 3: Die morphologische Klassifizierung dendritischer Dornen. Schematische Darstellung der Morphologieklassen dendritischer Dornen in stummelförmige, dünne, pilzförmige und filopodienähnliche Dornfortsätze. Modifiziert nach Yuste und Bonhoeffer (2004).

4.2.2 Dendritische Dornfortsätze als funktionelles Kompartiment

Dendritische Dornen stellen dynamische Strukturen dar, die in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium, der räumlichen Lokalisierung im Kortex, der synaptischen Aktivität und bezüglich pathologischer Faktoren variierbar sind (Jones und Powell 1969, Fiala et al. 1998, Dunaevsky et al. 1999, Shepherd 1996, Fischer et al. 1998). Sie formen Mikrokompimente für meist nur eine einzelne Synapse (Shepherd 1996, Hering und Sheng 2001). Ein schmaler Hals grenzt den Dornfortsatzkopf vom dendritischen Schaft ab und generiert somit ein Dornen-spezifisches Kompartiment für isolierte postsynaptische chemische Reaktionen einzelner Synapsen, wie beispielsweise die Erhöhung der Konzentration von Calcium-Ionen (Sabatini et al. 2001, Tada und Sheng 2006, Sheng und Hoogenraad 2007). Die Morphologie der dendritischen Dornen weist eine große Heterogenität auf (Harris und Kater 1994) und korreliert eng mit ihrer synaptischen Funktion (Yuste und Bonhoeffer 2001). Der Dornenhals bildet eine Engstelle zwischen Dornenkopf und Dendrit. Er fungiert als Filter für elektrische Spannungen (Svoboda et al. 1996). Überdies beeinflusst die Halslänge Ausmaß und Dauer des Calcium-Ionen Stroms (Svoboda et al. 1996). Ein kurzer Dornenhals evokiert einen schnelleren Calcium Einstrom in den dendritischen Schaft, da die Distanz zwischen Dornenkopf und Dendriten gering ist. Bei längeren Halsen erfolgt, bedingt durch die ausgeprägtere Abgrenzung des Dornenkopfes vom Dendrit, initial ein größerer Anstieg von Calcium-Ionen. Der Abbau von intrazellulären Calcium-Ionen verläuft aufgrund der längeren Distanz zwischen Kopf und Dendriten hingegen langsamer. Längere Dornen sind unabhängiger vom Dendriten als kürzere (Volfovsky et al. 1999). Untersuchungen von Araya et al. (2006) zeigten, dass ein langer Dornenhals synaptische Potenziale abschwächt und die Länge des Halses eine entgegengesetzt proportionale Korrelation zur Amplitude gemessener Ströme am Soma des Neurons aufweist (Araya et al. 2006). Die Kopfgröße ist zur PSD, zur Anzahl postsynaptischer Rezeptoren und Calcium-Ionen sowie zur Anzahl angedockter Vesikel der präsynaptischen aktiven Zone proportional (Harris und Stevens 1989, Hering und Sheng 2001, Nusser et al. 1998, Schikorski und Stevens 1999, Yuste und Bonhoeffer 2001). Größere dendritische Dornen tragen dementsprechend eine höhere Anzahl Glutamatre-

zeptoren, besitzen einen umfangreicheren intrazellulären Calciumspeicher und sind effizienter in endosomalen Rezyklierungs- und Proteintranslationsprozessen (Bourne und Harris 2008). Kleinere, unreife Dornen sind hingegen morphologisch flexibler (Matsuzaki et al. 2004).

4.2.3 Formierung dendritischer Dornen und synaptische Plastizität

Strukturelle und funktionelle Veränderungen in dendritischen Dornen und Synapsen bilden die Basis für Lernen und Gedächtnis im Gehirn (Harris et al. 1992). Eine exakte Kontrolle der Reifung und Konnektivität von Synapsen ist kritisch für eine akkurate neuronale Netzwerkaktivität sowie normale Funktion der Großhirnrinde (Hotulainen und Hoogenraad 2010). Während der frühen Synaptogenese befinden sich auf dem dendritischen Schaft pyramidalen Neuronen eine Vielzahl filopodienähnlicher Ausläufer (Dailey und Smith 1996, Dunaevsky et al. 1999). Es handelt sich dabei um lange, dünne Ausstülpungen ohne Kopf, die transiente Vorwölbungen darstellen und sich schnell ausbilden und wieder zurückziehen können (Dailey und Smith 1996, Hering und Sheng 2001). Da filopodienähnliche Ausläufer v.a. während der Entwicklungszeit des Nervensystems zahlreich festzustellen sind (Hering und Sheng 2001), werden sie in diversen Untersuchungen als putative Vorstufe dendritischer Dornen angesehen, die mit voranschreitender Entwicklung in reifere Formen transformiert werden (Dailey und Smith 1996, Ziv und Smith 1996, Fiala et al. 1998, Bhatt et al. 2009). Die Dornenentwicklung beginnt, basierend auf diesen Beobachtungen, mit einem adhäsiven Kontakt zwischen dem filopodienähnlichen Ausläufer und der Präsynapse (Ziv und Smith 1996). Andere elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass in jungen pyramidalen Neuronen die Mehrheit der Synapsen direkt auf dem dendritischen Schaft zu detektieren ist (Mates und Lund 1983). Somit stellt die Entwicklung der Synapsen auf dendritischen Dornfortsätzen aus Schaftsynapsen eine weitere Alternative des Dornenursprungs dar (Harris et al. 1992, Dailey und Smith 1996). Möglich ist auch eine Verknüpfung beider Beobachtungen. Auf die Ausbildung vieler initial gebildeter synaptischer Kontakte folgt eine Rückbildung in atypische Dornen oder in Schaftsynapsen (Fiala et al. 1998). Einige dieser Dornen können sich anschließend in stabile Dornfortsätze umformieren (Harris et al. 1992, Ziv und Smith 1996, Bourne und Harris 2008). Dornen können sich auch gegenläufig wieder in Filopodien zurückentwickeln (Parnass et al. 2000, Hering und Sheng 2001). Sie sind in der Lage, innerhalb von min Gestalt und Größe zu ändern (Dunaevsky et al. 1999,

Lendvai et al. 2000, Fischer et al. 1998). Besonders in jungen Individuen unterliegen die Dornen noch einer starken Dynamik, die während der postnatalen Reifung abnimmt, aber auch im adulten Alter noch vorhanden ist (Dunaevsky et al. 1999, Star et al. 2002). Neubildung und Eliminierung von Dornfortsätzen sind lebenslang stattfindende und mit zunehmenden Alter regredierende Prozesse, sodass in adulten Neuronen die morphologische Umgestaltung überwiegt (Grutzendler et al. 2002, Forrest et al. 2018). Die Dornenentwicklung korreliert zeitlich eng mit der Synaptogenese (Yuste und Bonhoeffer 2004, Bhatt et al. 2009). Durch synaptische Aktivierung können dendritische Dornen zwischen ihren morphologischen Klassen wechseln und sich zu stabileren Formen entwickeln (Yuste und Bonhoeffer 2001). Eine reife Morphologie ist durch einen ausgebildeten Kopf gekennzeichnet (Fiala et al. 1998, Parajuli et al. 2017), wie er besonders bei pilzförmigen Dornen vorhanden ist. Bereits 1973 zeigten Beobachtungen, dass aus kortikaler Stimulation strukturelle Anpassungen dendritischer Dornen und somit langanhaltende Veränderungen der synaptischen Übertragung resultieren (Bliss und Lømo 1973). Synaptische Aktivierung führt in Dornfortsätzen zu einer Vergrößerung des Kopfes und Verkürzung des Halses (Yuste und Bonhoeffer 2001). Funktionell führt sie zu einer Erhöhung der Konzentration intrazellulärer Calcium-Ionen (Wickens 1988), welche wiederum einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran bedingt (Collingridge et al. 1983, Malenka et al. 1988). Dieser Vorgang wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet und führt zu einem Anstieg synaptischer Ströme, zur Neubildung von dendritischen Dornfortsätzen oder zur Vergrößerung des Kopfes bestehender Dornen (Muller et al. 2002, Malenka et al. 1988). Im Gegensatz dazu kommt es bei einer langanhaltenden verminderten synaptischen Aktivität zur Endozytose beziehungsweise (bzw.) Diffusion von AMPA-Rezeptoren zu extrasynaptischen Membranpositionen und somit zur Langzeitdepression (LTD) (Bliss und Lømo 1973). Diese Prozesse bilden die essenzielle Grundlage für höhere kognitive Funktionen und die neuronale Plastizität (Hopfield 1982). LTP und LTD basieren auf Rezeptor-vermittelten Signalwegen. Neben der Expression bestimmter Gene spielt die lokale Proteinsynthese sowie ein funktionierendes dynamisches Aktinnetzwerk (Hotulainen und Hoogenraad 2010) eine wichtige Rolle für diese Prozesse. Die Interaktion des Aktinzytoskeletts mit Gerüstproteinen der PSD ist für die Entwicklung und Dynamik der Dornfortsätze von grundlegender Bedeutung (Dunaevsky et al. 1999, Fischer et al. 1998, Tada und Sheng 2006).

4.3 Die Proteine der Syndapin-Familie

4.3.1 Expression und Struktur

Fundamentale Bedeutung für Membrantransportprozesse neuronaler Zellen und morphologische Veränderungen der zerebralen Architektur sowie eine entscheidende Rolle in endozytotischen Prozessen, akkurater Rezeptorintegrität und somit elementare Relevanz in angemessenen Gehirnfunktionen besitzt ein synaptisches Dynamin-assoziiertes Protein (Kessels und Qualmann 2002, Kessels und Qualmann 2006, Dharmalingam et al. 2009, Pérez-Otaño et al. 2006, Anggono et al. 2006, Schwintzer et al. 2011, Koch et al. 2011, Schneider et al. 2014). Syndapin I wurde in Rattengehirnextrakten als unbekannter Bindungspartner von Dynamin entdeckt (Qualmann et al. 1999) und als *PACSIN (protein kinase Ca and casein kinase 2 substrate in neurons)* in der Maus beschrieben (Plomann et al. 1998). Syndapine sind membranassoziierte Proteine, die in endozytotische Prozesse involviert sind (Kessels und Qualmann 2002, Kessels und Qualmann 2006). Sie sind eine molekulare Verbindung zwischen synaptischer Vesikelwiederverwertung sowie zytoskeletaler Organisation und für Modulierungen des Aktinzytoskellets essenziell (Qualmann und Kelly 2000). In Säugetieren sind bisher drei Isoformen der Syndapin-Familie bekannt. Die 424 bis 488 Aminosäuren (AS) langen Proteine unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster (Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999, Qualmann und Kelly 2000, Modregger et al. 2000, Sumoy et al. 2001, Kessels und Qualmann 2004). Das v.a. neuronal exprimierte Syndapin I ist ubiquitär im Gehirn verteilt und weist eine maximale Expression in terminal differenzierten Neuronen im adulten Gewebe auf (Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999, Modregger et al. 2000, Koch et al. 2011). In Neuronen ist Syndapin I in Dendriten, Präsynapsen und dendritischen Dornen lokalisiert (Braun et al. 2005, Qualmann et al. 1999, Pérez-Otaño et al. 2006, Schneider et al. 2014). Syndapin II weist ein ubiquitäres Vorkommen auf (Ritter et al. 1999, Qualmann und Kelly 2000), während Syndapin III vorwiegend in Herz und Skelettmuskel exprimiert wird, aber auch in Plazenta, Leber, Pankreas, Gehirn, Lunge und Niere vorhanden ist (Modregger et al. 2000, Sumoy et al. 2001).

Auch die Expression von Syndapin III in neuronalen Kompartimenten konnte in Western-Blot Analysen nachgewiesen und die Lokalisation in Dornfortsätzen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Elisa Engelmann, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena (UKJ)).

Die Domänenstruktur aller Syndapine zeichnet sich durch eine N-terminale Fes/CIP4-Homologie-Bin/Amphiphysin/Rvs (F-BAR)-Domäne und eine C-terminale Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne aus (Modregger et al. 2000, Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999, Ritter et al. 1999, Itoh et al. 2005). Syndapin III unterscheidet sich bezüglich des zwischen den Domänen liegenden *Linker*-Bereichs von den anderen Familienmitgliedern durch ein PXXP-Motiv, anstatt von Asparagin-Prolin-Phenylalanin (NPF)-Motiven (Modregger et al. 2000, Quan und Robinson 2013) (Abb. 4).

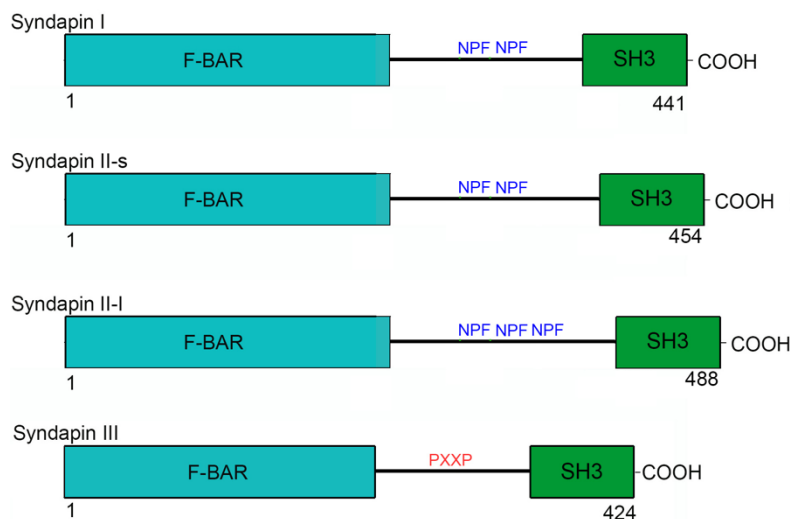


Abb. 4: Die Struktur der Syndapine. Syndapin I, Syndapin II-s, Syndapin II-l und Syndapin III bestehen im Menschen aus 441, 454, 488 bzw. 424 AS. Syndapin II kommt in einer kurzen (Syndapin II-s) und einer langen (Syndapin II-l) Spleißvariante vor. Die Isoformen der Syndapin-Familie besitzen die N-terminale F-BAR-Domäne und die C-terminale SH3-Domäne. Syndapin I und Syndapin II-s weisen weiterhin zwei NPF-Motive auf, während Syndapin II-l drei NPF-Motive und Syndapin III ein PXXP-Motiv be-

Mit Hilfe der F-BAR-Domäne sind Syndapine in der Lage Membranen zu erkennen und an sie zu binden. Sie sind fähig dimerisiert in Membranen zu inserieren und können positive Membrankrümmungen induzieren (Kessels und Qualmann 2006, Frost et al. 2008, Itoh et al. 2005, Dharmalingam et al. 2009). Die spezifische Funktion von F-BAR-Domänen enthaltenden Proteinen ist allerdings von den zusätzlichen Proteinmodulen eines Proteins und dessen Interaktionspartnern abhängig (Kessels und Qualmann 2015).

4.3.2 Die Interaktionspartner der Syndapine

Alle drei Syndapin-Isoformen können über ihre C-terminale SH3-Domäne mit Prolinreichen Motiven anderer Proteine interagieren (Plomann et al. 1998). Die

Proteinfamilie bindet an das vorwiegend für endozytotische Prozesse relevante Dynamin und gewährleistet über diese Interaktion eine korrekte Vesikelbildung (Qualmann et al. 1999). Weitere Interaktionspartner sind der Nukleationspromotionsfaktor N-WASP, der Aktinnukleator Cobl, die präsynaptisch lokalisierten Proteine Synapsin sowie Synaptojanin1 und die PSD-Gerüstproteine ProSAP1/2 (Ahuja et al. 2007, Modregger et al. 2000, Qualmann et al. 1999, Qualmann und Kelly 2000, Schneider et al. 2014). Die Fähigkeit zur Selbstassoziation ist elementar für Syndapin Funktionen (Kessels und Qualmann 2006). Dadurch können mehrere Interaktionspartner distinkter zellulärer Vorgänge miteinander assoziiert werden (Kessels und Qualmann 2006, Dharmalingam et al. 2009). Syndapine können die Neuromorphogenese beeinflussen, indem sie eine räumliche Verknüpfung des Aktinzytoskeletts mit Membranmodulationsvorgängen gewährleisten (Qualmann et al. 1999). Sie setzen N-WASP aus der Autoinhibition frei und fördern somit die Arp2/3-Komplexvermittelte Aktinnukleation, ein elementarer Vorgang für eine korrekte Ausbildung der Axone (Dharmalingam et al. 2009). Ferner beeinflussen Syndapine die korrekte Ausbildung des Dendritenbaumes. Syndapin I assoziiert mit Cobl und formt somit einen Interaktionskomplex, der zur Assoziation des Aktinnukleators mit der Membran beiträgt (Ahuja et al. 2007, Schwintzer et al. 2011, Hou et al. 2015). Im Zebrafischmodell konnte zusätzlich die Relevanz von Syndapin I-Cobl-Interaktionen für die fehlerlose Ausbildung aktinreicher Stereozilien sowie Mikrotubuli-basierter Kinozilien gezeigt werden (Schüler et al. 2013). Über die NPF-Aminosäuresequenz stellen Syndapin I und II Interaktionspartner für die an Vesikelrezyklierungsprozessen beteiligten Eps15-Homologie-Domänen (EHD)-beinhaltende Proteine dar (Braun et al. 2005, Quan und Robinson 2013). Des Weiteren können Syndapin I und II an die NMDA-Rezeptor-Untereinheit 3A (NR3A) binden und die NMDA-Rezeptorendozytose beeinflussen (Pérez-Otaño et al. 2006). *In-vitro* Analysen von Anggono et al. (2006) belegten die Interaktion von Syndapin I und Dynamin I in Nervenverbindungen (Anggono et al. 2006, Qualmann et al. 1999). Somit wurde Syndapin I vorwiegend über seine Membranmodulierungsfähigkeiten aber auch über seine Verbindungen zum Aktinzytoskelett eine Schlüsselrolle in der endozytotischen Maschinerie und somit in der synaptischen Vesikelendozytose, welche fundamental an der synaptischen Transmission beteiligt ist, nachgewiesen (Anggono et al. 2006, Andersson et al. 2008). *In-vivo* Untersuchungen in Syndapin I KO Mäusen verglichen mit WT belegten Defekte in präsynaptischen Membrantransport- und Vesikelabschnürungsprozessen

unter Syndapin I Defizienz, die sich in einer gestörten Vesikelrezyklierung, einer Akkumulierung endozytotischer Zwischenprodukte sowie in vergrößerten präsynaptischen Vesikeln äußerten (Koch et al. 2011). Syndapin I KO Mäuse leiden überdies an generalisierten Krampfanfällen (Koch et al. 2011). Makroskopisch wurde in Syndapin I KO Mäusen ein vergrößerter Hippocampus mit gesteigerter hippocampaler Netzwerkaktivität und einer erhöhten Neigung zu überdurchschnittlichen epileptiformen Entladungen detektiert (Koch et al. 2011). Elektrophysiologische Messungen in Hippocampusschnitten Syndapin I-defizienter Mäuse belegten Störungen in der synaptischen Transmission (Koch et al. 2011, Schneider et al. 2014). Weitere Analysen zeigten, dass Syndapin I Defizienz eine signifikante Reduzierung von Synapsen und dendritischen Dornen verursacht und Syndapin I durch seine Rolle in endozytotischen Prozessen sowie durch seine Interaktion mit z.B. dem PSD-Gerüstprotein ProSAP1 postsynaptische Funktionen in Bildung und Erhaltung dendritischer Dornfortsätze besitzt (Pérez-Otaño et al. 2006, Anggono et al. 2006, Schneider et al. 2014). Ausschließlich in Anwesenheit von Syndapin I erfolgt eine korrekte räumliche Zuordnung von ProSAP1, welches für die PSD-Organisation und somit für die korrekte Ausbildung der Postsynapse relevant ist (Schneider et al. 2014). Weiterhin reguliert ProSAP1 die Dornfortsatzbildung und ist somit fundamental in die Ausprägung synaptischer Kontakte involviert (Grabrucker et al. 2011). Die Defizienz von ProSAP1/SH3-Domänen/Ankyrin-Wiederholung-beinhaltenes Protein (Shank)2 und ProSAP2/Shank3 wurde mit reduzierter Synapsendichte und Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) assoziiert (Berkel et al. 2012, Peca et al. 2011, Schmeisser et al. 2012).

4.3.3 Funktionen von Syndapin III

Aufgrund der den anderen Syndapin-Isoformen annähernd konformen Domänenstruktur können ähnliche Interaktionspartner und neuronale Funktionen für Syndapin III erwartet werden (Modregger et al. 2000, Sumoy et al. 2001). Die SH3-Domänenvermittelte Bindung an die Proteine Dynamin, Synaptojanin und N-WASP wurde bereits für Syndapin III gezeigt (Modregger et al. 2000). Alle Syndapin-Familienmitglieder sind für Vesikelformierung sowie Vesikeltransport essenziell und beeinflussen endozytotische Prozesse (Modregger et al. 2000). Analysen von Sumoy et al. (2001) belegten, dass auch die Syndapin-Isoform Syndapin III das Aktinzytoskelett moduliert (Sumoy et al. 2001, Qualmann und Kelly 2000). Im Unterschied zu

den Syndapin I KO Tieren zeigen kürzlich generierte Syndapin III KO Mäuse keine epileptische Krampfanfälle, jedoch einen Phänotyp der Skelettmuskulatur (Koch et al. 2011, Seemann et al. 2017). Analysen von Seeman et al. (2017) belegten, dass Syndapin III eine fundamentale Rolle in caveolären Prozessen spielt und bei der Ausbildung von Caveolen entscheidend beteiligt ist (Seemann et al. 2017). Caveolen sind im Durchmesser 50-70 nm große Invaginationen der Zellmembran. In Muskelzellen von Syndapin III KO Mäusen ist im Vergleich zum WT eine Reduzierung der Dichte von Caveolae zu detektieren, was bei stärkerer körperlicher Beanspruchung zu einer gestörten Integrität der Muskulatur, ähnlich wie in Caveolinopathien, führt (Seemann et al. 2017). Kürzlich erhobene Western-Blot Analysen, belegten, dass Syndapin III im murinen Gehirn bereits pränatal zum Tag E16 in nachweisbaren Mengen exprimiert wird und somit schon zu früheren Entwicklungszeitpunkten neuronal vorhanden ist (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Syndapin III KO-Analysen durch Morpholino Oligos in Zebrafischembryonen zeigten eine wichtige Rolle von Syndapin III in der frühen Formierung der Chorda dorsalis und somit in der Regulierung der frühen Zellmigration (Edeling et al. 2009). Ferner reguliert Syndapin III den Einbau des Glucosetransporters 1 in die Plasmamembran und ist somit an der insulinunabhängigen Glukoseversorgung von Geweben, wie z.B. des ZNS über die Blut-Hirn-Schranke, beteiligt (Roach und Plomann 2007). Proteomische Analysen von Thornhill et al. (2007) zeigten überdies eine Interaktion von Syndapin III mit dem Fas-Liganden (FasL) in Schwann-Zellen (Thornhill et al. 2007). Aufgrund der erhöhten Expression von FasL in Gliazellen, Schwann-Zellen und Neuronen nach Verletzungen des Nervensystems könnte Syndapin III eine putative Rolle in Regenerationsprozessen des Nervensystems besitzen, indem es die Expression von FasL unterstützt (Choi und Benveniste 2004, Thornhill et al. 2007). Es wurde speziell für Syndapin III gezeigt, dass es die Endozytose und die Lokalisierung des *transient receptor potential cation channel subfamily V member 4* (TRPV4)-Rezeptors beeinflusst (Cuajungco et al. 2006).

Kürzliche Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten einen distinkten Verhaltensphänotypen unter Syndapin III Defizienz, der sich in Störungen im Sozialverhalten sowie einem abweichenden Nestbauverhalten mit flacheren, weniger komplexen Nestern von Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT manifestierte (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Zur Quantifizierung des verminderten Sozialverhaltens der Syndapin III KO Mäuse

wurden umfangreiche Verhaltensversuche im Einwohner-Eindringling-Test und im Drei-Kammer-Test durchgeführt. Im Einwohner-Eindringling-Test wurden WT und Syndapin III KO Mäuse für zwei Wochen isoliert und anschließend für 20 min einer fremden Maus ausgesetzt. Die Zeit in direkter Interaktion mit der Fremdmaus war unter Syndapin III Defizienz im Vergleich zu WT signifikant reduziert (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Der Drei-Kammer-Test belegte konträr zu WT keine Präferenz der Syndapin III KO Mäuse zwischen ihren Artgenossen und einem Objekt sowie zwischen bekannten Mäusen und Fremdmäusen. Nachdem sich die Mäuse in der ersten Phase des Testes an ihre Umgebung gewöhnen, wird in der zweiten Phase des Testes eine fremde Maus in die rechte Kammer der Testarena und ein Objekt in die linke Kammer gesetzt. Während WT eine statistisch signifikante Bevorzugung der fremden Maus im fünf bis zehn min Intervall zeigten, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Fremdmaus und dem Objekt in Syndapin III KO Mäusen detektiert. In Phase drei des Testes wurde das Objekt gegen eine weitere fremde Maus getauscht. Bei Syndapin III KO Mäusen konnte hierbei keine Präferenz für die neue Maus beobachtet werden, während WT diese signifikant bevorzugten (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ).

Des Weiteren zeigten sich in histologischen Untersuchungen des Neokortex von 20 Wochen alten Syndapin III KO Mäusen eine Verlängerung und eine Volumenzunahme des Dendritenbaumes von Schicht II/III- und Schicht V-Pyramidenzellen. Bei Analysen der Ausdehnung der kortikalen Schichten sowie der Anzahl an Neuronen in den Schichten II/III-V wurden im Vergleich der Genotypen jedoch keine Unterschiede detektiert (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Verhaltensanalysen und Untersuchungen der Dendritenbäume von Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen im Neokortex korrelieren zeitlich. Die Mäuse waren zu Beginn der Verhaltensstudie und zum Zeitpunkt der Dendritenanalyse 20 Wochen alt.

4.4 Klinische Aspekte

Ein angemessenes Sozialverhalten wird durch Integration verschiedener kognitiver Prozesse, wie Wahrnehmung, Erkennung und Bewertung des sozialen Umfelds, gewährleistet. Dafür interagiert ein Netzwerk kortikaler zerebraler Strukturen mit dem Temporallappen und der Amygdala (Adolphs 1999). Zentrale Prozesse sozialer

Kognition modulieren Effektor-Systeme, insbesondere Motorkortex sowie Basalganglien, und aktivieren Emotionen-steuernde Regionen, wie Hypothalamus und das periaquäduktale Grau des Hirnstamms (Adolphs 2001). Nur mittels physiologischer Funktion und präziser Interaktion dieser Vielzahl von zerebralen Strukturen kann die soziale Wahrnehmung in einem angemessenen sozialen Verhalten resultieren. Die Exploration der Ursachen von abweichendem Sozialverhalten bedürfen komplexer Untersuchungsverfahren, da die soziale Interaktion die Partizipation von zwei Individuen bzw. einer Gruppe benötigt und somit individuelle Rückschlüsse schwierig sind (Long et al. 2004). Strukturelle Untersuchungen kortikaler Regionen zeigten bereits eine zentrale Bedeutung der Morphologie und Anzahl dendritischer Dornfortsätze in pathophysiologischen Prozessen neuropsychiatrischer Erkrankungen, was eine klinische Relevanz für eine präzise Untersuchung dieser neuronalen Strukturen begründete (Penzes et al. 2011). Erkrankungen wie ASD, Alzheimer (AD) und Schizophrenie sind durch Störungen in komplexen neuronalen Informationsprozessierungen und kognitiven Funktionen des Kortex charakterisiert (Forrest et al. 2018). Studien belegten zusätzlich eine veränderte synaptische Konnektivität sowie Plastizität in den Gehirnen betroffener Patienten (Selemon und Goldman-Rakic 1999, Hutsler und Zhang 2010, Glantz und Lewis 2000, Tackenberg et al. 2009, Forrest et al. 2018). Die diversen Symptome neuropsychiatrischer Erkrankungen manifestieren sich zu distinkten Zeitpunkten im Leben, müssen allerdings zeitlich nicht mit der ursächlichen strukturellen oder funktionellen synaptischen Veränderung korrelieren. Beispielsweise wird Schizophrenie bei einem gewissen Anteil der betroffenen Patienten bereits pränatal durch zytoarchitektonische Anomalien verursacht und somit auch als kortikale Entwicklungsstörung klassifiziert, welche sich allerdings zumeist erst im jungen Erwachsenenalter manifestiert (Fatemi und Folsom 2009, Rapoport et al. 2005). Epidemiologische Daten zeigten ein bevorzugtes Auftreten der Schizophrenie bei Menschen zwischen 20 und 32 Jahren, was dem Zeitpunkt der vollständigen Ausreifung von Struktur und Funktion des Gehirns in den kortikalen Netzwerken entspricht (Stilo und Murray 2010). Im Zusammenhang mit der Auffassung, dass Schizophrenie eine neuronale Entwicklungsstörung darstellt, wurden Beeinträchtigungen der Konnektivität von Synapsen sowie neuronaler Netzwerke und insbesondere der intrakortikalen Kommunikation bereits von pränatalen Zeitpunkten beginnend vorgeschlagen (McGlashan und Hoffman 2000). Da sich neuropsychiatrische Erkrankungen bereits von frühen embryonalen Reifungsprozessen an über längere Zeitspan-

nen hinweg entwickeln und später manifestieren können, obliegt der embryonalen Gehirnentwicklung eine klinische Relevanz für die Identifizierung ätiologischer Faktoren dieser Krankheiten. Die Rekapitulation der gesamten Pathologie einer Erkrankung ist komplex, jedoch können mittels isolierter Analysen einzelner Symptome, beispielsweise in Tiermodellen, Einblicke in spezifische Aspekte pathophysiologischer Prozesse gewonnen werden (Seong et al. 2002).

5 Ziele der Arbeit

In Säugetieren konstituiert die funktionelle Architektur der Großhirnrinde optimale Rahmenbedingungen für komplexe kognitive Funktionen. Der Kortex gewährleistet ein Höchstmaß an Spezialisierung und integriert zugleich Informationen multipler neuronaler Netzwerke, um adäquate komplexe Verhaltensweisen zu gewährleisten. Von besonderer Bedeutung für synaptische Verbindungen und ferner neuronale Kommunikation ist das molekulare Repertoire synaptischer Proteine. Des Weiteren stellt eine akkurate zelluläre Morphologie die Basis der physiologischen Entwicklung des Gehirns dar. Störungen in neuronalen Netzwerken wurden bereits mit pathophysiologischen Prozessen in zahlreichen neurologischen Krankheiten assoziiert.

Das ubiquitär und überall in Neuronen bereits pränatal exprimierte Protein Syndapin III gehört zur Syndapin-Familie. Da bisher kaum Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Syndapin III auf kortikale Prozesse bekannt waren, sollten erste Einblicke in diese Prozesse in Syndapin III KO Mäusen gewonnen werden.

Es sollte daher im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die komplexe Architektur des zerebralen Kortex mit Fokus auf dendritische Dornfortsätze untersucht und somit analysiert werden, ob es zu einer Veränderung der Dichte sowie Klassenverteilung bzw. Morphologie oder Länge der dendritischen Dornfortsätze von Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen im Neokortex kommt. Für die Untersuchungen sollten Aufnahmen von Golgi-gefärbten Dendriten des Neokortex dreidimensional rekonstruiert und anschließend in morphologische Gruppen von Dornfortsätzen klassifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die embryonale Entwicklung untersucht werden, wofür zunächst die strukturelle Organisation des embryonalen zerebralen Kortex durch Analysen der Ausdehnung der Kortikalen Platte, Ventrikularzone und der Kortikalen Wand mittels Nissl-gefärbter Kortexschnitte bestimmt wurde. Ergänzend sollten Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung von Antikörpern gegen neuronale Vorläuferzellmarker und Schichtenmarker durchgeführt werden, um die Anzahl neuronaler Vorläuferzellen sowie Neurone hoher und tiefer Kortexschichten zu identifizieren.

Ziel der geplanten Analysen war es, wichtige neue Erkenntnisse bezüglich der Mechanismen, die zur Ausprägung eines adulten Phänotyps im Sozialverhalten unter Syndapin III Defizienz führen, zu gewinnen. Diese Daten können schließlich das Verständnis pathophysiologischer Prozesse kortikaler Entwicklungsstörungen verbessern. Perspektivisch könnten die Ergebnisse dazu beitragen, die Behandlung von neuropsychiatrischen Krankheiten zu optimieren.

6 Methodik

6.1 Material

6.1.1 Mauslinien

In dieser Arbeit wurde der Stamm B6;129/Sv-Pacsin3^{tm1BQ} verwendet. Dieser Stamm wurde durch Deletion des Exons 5 bzw. 6 des Syndapin III Gens nach dem Cre/loxP-System generiert und führte zum konstitutiven Ausschalten des Syndapin III Gens (Seemann et al. 2017). Sowohl wildtypische (WT) als auch Syndapin III *knockout* (KO) Mäuse wurden aus heterozygoter Verpaarung verwendet. Die Tierhaltung erfolgte unter einem 14/10 Hell-Dunkelzyklus mit einer Maximalanzahl von 5 Tieren pro Käfig. Sowohl Futter als auch Wasser stand den Mäusen permanent zur Verfügung.

6.1.2 Chemikalien und Laborreagenzien

Bovines Serumalbumin (BSA) (Fraktion V)	Sigma-Aldrich [®] Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Entellan [®]	Merck Millipore, Burlington Massachusetts, USA
Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Fluoromount-G [®] <i>mouse on mouse</i> (MOM)	SouthernBiotech, Birmingham, USA LINARIS Biologische Produkte GmbH, Mannheim
Pferdeserum	Gibco [®] Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Stickstoff	Linde AG, München
Tissue-Tek [®] <i>optimum cutting temperature</i> (O.C.T.) TM <i>compound</i>	Sakura Finetek, Heidelberg
Triton [®] X-100	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe

6.1.3 Puffer und Lösungen

Acetat-Puffer	321 mM (Millimolar) Natriumacetat in
---------------	--------------------------------------

	zweifach destilliertem Wasser (ddH ₂ O); 1,2% (Volumenprozent (v/v)) Essigsäure (pH-Wert (pH) 3,6)
Blockierlösung 1 für Immunfluoreszenz- färbung	0,1% (v/v) Triton [®] X-100; 2% (Gewichts- prozent (w/v)) BSA (Fraktion V); 3% (v/v) Pferdeserum; 1x PBS (Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung) (pH 7,4)
Blockierlösung 2 für Immunfluoreszenz- färbung	2% (w/v) BSA (Fraktion V); 10% (v/v) Pferdeserum; 1x PBS (pH 7,4)
Citrat-Puffer für Immunfluoreszenzfär- bung (Antigendemaskierung)	10 mM Natriumcitrat; 0,05% (v/v) Tween [®] 20 (pH 7,4)
50%/70%/ 95%iges Ethanol	50%/70%/ 95% (v/v) Ethanol in ddH ₂ O
Ethanol/Eisessig-Lösung	95% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Eisessig
Kresylviolettlösung	15,5 mM Kresylviolett in Acetat-Puffer gelöst und abfiltriert
Oldenburg-Puffer für Immunfluoreszenz- färbung	0,3% (v/v) Triton [®] X-100; 50 mM Tris; 1,5% (w/v) NaCl
4% Paraformaldehyd (PFA) (w/v)	1,3 M PFA in PBS; Titration mit 0,1 M NaOH auf pH 7,2
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,13 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,76 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5)
10%/30%ige Saccharose-Lösung	10%/30% (w/v) Saccharose in PBS
Waschpuffer für Immunfluoreszenzfär- bung	0,2% (v/v) Triton [®] X-100 in PBS (pH 7,4)

6.1.4 Antikörper

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten primären Antikörper für die immunfluoreszenten Färbungen sowie die verwendeten Verdünnungen befinden sich in Tabelle 1, sekundäre Antikörper sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper.

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Referenz/ Firma	Katalog-/ Bestell- nummer

anti-Brn2 (C-20)	Ziege	1:100	Santa Cruz <i>Biotechnology, Inc.</i> ¹	sc-6029
anti-COUP-TF-interacting protein 2 (Ctip2)	Kaninchen	1:100	Abcam [®] plc ²	ab28448
anti-cut-like homeobox 1 (Cux1) (M-2222)	Maus	1:100	Santa Cruz <i>Biotechnology, Inc.</i> ¹	sc-13024
anti-forkhead-box-protein 2 (Foxp2)	Ziege	1:100	Abcam [®] plc ²	ab1307
anti-Sox2	Ziege	1:100	Abcam [®] plc ²	ab110145
anti-Tbr2	Kaninchen	1:500	Abcam [®] plc ²	ab23345

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper.

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Referenz/ Firma	Katalog-/ Bestell- nummer
Maus-Alexa Fluor [®] (AF) 488	Esel	1:250	<i>Molecular Probes</i> [®] (MP) Invitrogen GmbH ³	A-11029
Ziege-AF 488	Esel	1:250	MP Invitrogen GmbH ³	A-11055
Kaninchen-AF 568	Esel	1:250	MP Invitrogen GmbH ³	A10042
Maus-AF 647	Esel	1:250	MP Invitrogen GmbH ³	A-31571
Ziege-AF 647	Esel	1:250	MP Invitrogen GmbH ³	A-21447

Dallas, Texas, USA¹; Cambridge, Vereinigtes Königreich²; Eugene, Oregon, USA³

6.1.5 Verbrauchsmaterialien

Assistent Pasteurpipetten, lange Form 230 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Deckgläser Stärke Nummer 1 rechteckig (24×50 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einweg-Pasteurpipetten, graduiert Eppendorf <i>Safe-Lock</i> TM (Verschluss)	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe Eppendorf AG, Hamburg
Gefäße (0,5 Milliliter (ml); 1,5 ml; 2 ml)	
Falcon-Gefäße (15 ml; 50 ml)	Grate HDS, Melbourne, Australien
Färbetrog und Einsatz für Objektträger	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Menzel Objektträger <i>SuperFrost Ultra Plus</i>	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen (2-200 µl; 50-1000 µl)	Brand, GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (0,1-10 µl)	STARLAB GmbH, Altenburg
Shandon TM Deckplatten	Thermo Fisher <i>Scientific</i> GmbH, Waltham, Massachusetts, USA

6.1.6 Geräte und Software

Kryostat

Open-Top-Kryostat CM 3050S Leica *Biosystems* GmbH, Nußloch

Mikroskope

Axio Imager D1 Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Göttingen

Konfokales Laser-*Scanning*-Mikroskop Leica *Microsystems* GmbH, Wetzlar

LSM Leica TCS SP5

Pipetten

Eppendorf Research[®]/ Research[®] plus Eppendorf AG, Hamburg

Elektronische Transferpette[®]-8/-12 Brand, GmbH & Co. KG, Wertheim

Präparierbesteck

Präparierbesteck Carl Roth[®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Software

Adobe Photoshop Version 2017.1.1 Adobe *Systems*, Inc., San José,
Kalifornien, USA

GraphPad Prism 8.0	GraphPad <i>Software</i> , Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ 1.51n	<i>National Institutes of Health</i> ; BioVoxxel, Bethesda, Maryland, USA
Imaris V7.7.1, 8.0.2	BITPLANE AG, Zürich, Schweiz
LAS AF 3	Leica <i>Microsystems</i> GmbH, Wetzlar
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft <i>Corporation</i> , Redmont, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft <i>Corporation</i> , Redmont, USA
Zen2 Core	Carl Zeiss <i>Microscopy</i> GmbH, Göttingen
Vortexer	
Vortex-Genie® 2	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Waage	
LC4800P	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugen	
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 5417R, kühlbar	Eppendorf AG, Hamburg

6.2 Histochemische Methoden

6.2.1 Färbung nach Camillo Golgi

6.2.1.1 Anfertigung der Golgi-Färbung von Gehirnschnitten

Die Färbung der murinen wildtypischen und Syndapin III-defizienten Gehirne erfolgte mittels der Golgi-Färbemethode. Ebenso wie die mikroskopischen Aufnahmen der Golgi-gefärbten Gehirnschnitte wurde die Färbung im Vorfeld der Arbeit von Elisa Engelmann (Institut für Biochemie I, UKJ) durchgeführt. Die Golgi-Methode wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe angewendet und beschrieben (Pickrodt 2017).

6.2.1.2 Analyse dendritischer Dornen unter Verwendung der Imaris Software

Für die Untersuchung der Dendritenbaummorphologie wurden Aufnahmen von Golgi-gefärbten Dendriten von Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen des Neokortex in invertierten hellfeldmikroskopischen z-Stapelaufnahmen mittels des Imaris *Filament Tracer*-Moduls unter jeweiliger Verwendung des *shortest distance*-Algorithmus dreidimensional rekonstruiert. Es wurden ausschließlich basale (sekundäre) Dendriten

zweiter Ordnung der Pyramidenzellen der Schicht II/III und Schicht V des sensomotorischen Neokortex 20 Wochen alter WT und Syndapin III KO Mäuse verwendet. Die Analyse der dendritischen Dornfortsätze erfolgte an allen vorhandenen Dornfortsätzen, die eine Mindestkopfbreite von $0,2\ \mu\text{m}$ aufwiesen und eine Maximallänge von $5,0\ \mu\text{m}$ nicht überschritten. Die Dornfortsatzköpfe wurden manuell gesetzt und bei abweichender Dornfortsatzhalsrekonstruktion des Programms nochmalig per Hand präzisiert. Eine detaillierte Aufschlüsselung in morphologisch klassifizierbare Gruppen (stummelförmige, dünne, pilzförmige und filopodienähnliche Dornen) erfolgte mittels des integrierten MATLAB-Klassifizierungsmoduls nach der in Tabelle 3 dargestellten Konfiguration. Weiterführende Informationen sowie Voreinstellungen und angewandte Formeln zur Berechnung der Parameter können dem Benutzerhandbuch der *Imaris-Software* der BITPLANE AG, Zürich, Schweiz entnommen werden. Veränderungen der postsynaptischen Morphologie wurden quantitativ mittels der Dichte dendritischer Dornfortsätze, der relativen prozentualen Verteilungen der einzelnen Morphologiegruppen sowie Veränderungen von Kopfweite sowie Kopfvolumen und Dornenlänge analysiert. Filopodienähnliche Dornen wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, da sie definitionsgemäß lange, dünne Vorwölbungen des Dendriten darstellen und keinen Kopf besitzen (Hering und Sheng 2001). Die Kopfweite entsprach der maximalen Kopfbreite des Dornfortsatzkopfes im rechten Winkel zur Längsachse des Dornenhalses. Das Kopfvolumen resultierte aus dem Volumen der proximal gelegenen 25% des dendritischen Dornfortsatzes. Des Weiteren wurde die Dornfortsatzlänge bestimmt, welche dem Abstand gemessen von der Basis des Dornenhalses bis zum weitesten entfernten Punkt des Kopfes entsprach. Ausgewertet wurden 15-16 Dendritenabschnitte von Pyramidenzellen sowohl in der Kortexschicht II/III als auch in der Kortexschicht V von jeweils drei WT und drei Syndapin III KO Mäusen (ca. 20 Wochen alt). Für die ersten zehn Dendritenabschnitte erfolgte eine verblindete Auswertung. Zur Erhöhung der Stichprobenanzahl (n-Wert) wurden anschließend an die initiale Analyse pro Schicht und Genotyp weitere fünf bis sechs Zellen ausgewertet, nachdem die Verblindung bereits aufgehoben wurde.

Tabelle 3: Einteilung dendritischer Dornfortsätze in Morphologiegruppen.

Feld	Befehl
Stummelförmig	Dornenlänge < 0,75 µm
Pilzförmig	Dornenlänge > 0,75 µm; maximale Kopfbreite > 0,5 µm
Dünn	Dornenlänge > 0,75 µm; maximale Kopfbreite < 0,5 µm und maximale Kopfbreite > 0,3; durchschnittliche Halsbreite < maximale Kopfbreite
Filopodienähnlich	alle restlichen, detektierten Dornenfortsätze
Kopflänge	25% (distal)
Basislänge	25% (proximal)

6.2.2 Nissl-Färbung und immunfluoreszente Färbung

6.2.2.1 Präparation der Mausgehirne

Das Gehirn wurde nach Abtrennung des Kopfes der embryonalen Maus entnommen. Unter Schonung der Hirnsubstanz wurde die Schädeldecke medial eröffnet, das Gehirn stumpf von der Schädelbasis abgetrennt, anschließend über Nacht (ÜN) zunächst in 4% PFA in PBS fixiert und darauffolgend eine weitere Nacht in 10%iger Saccharose-Lösung bei 10 Grad Celsius (°C) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Überführung der murinen Gehirne in eine 30%ige Saccharose-Lösung zur Kryoprotektion für mindestens 24 Stunden (h) bis zu ihrer Verwendung.

6.2.2.2 Anfertigung von koronalen Gehirnschnitten am Kryostat und Überführung auf die Objektträger

Die Anfertigung koronaler Gehirnschnitte erfolgte am Kryostat. Hierfür wurden zunächst die imprägnierten Mäusegehirne mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Unter Zuhilfenahme von Tissue-Tek® O.C.T™ *compound* fand die Fixierung am Trägertisch statt. Zur Akklimatisierung wurden die Mäusegehirne bei einer Kammertemperatur von -20°C im Kryostat für ungefähr eine halbe h belassen. Bei einer Objekt- und Kammertemperatur von ungefähr -20°C sind die eingespannten Gehirne unter Verwendung des Kryostats in 25 µm dicke koronale Stücke geschnitten worden. Dabei mussten zunächst mithilfe der Trimmfunktion die Bulbi reseziert werden, um in die zu analysierende Kortexregion zu gelangen. Anschließend erfolgte die Übertragung der koronalen Schnitte auf die Objektträger, wobei unter Verwendung eines Pinsels die

Entfernung von Luftblasen erfolgte. Nach 2 h Trocknen auf einer Heizplatte wurden die Gehirnschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

6.2.2.3 Nissl-Färbung muriner Gehirnschnitte

Zur Visualisierung neuronaler Strukturen wurde die Nissl-Färbemethode verwendet, welche bereits zuvor in der Literatur beschrieben wurde (Amunts et al. 1999, Augustinack et al. 2005). Bei dieser werden Bestandteile des Zellkerns sowie die basophile Nisslsubstanz (Ribonukleinsäure-reiches raues endoplasmatisches Retikulum) der Nervenzellen angefärbt. Die Nissl-Färbung wurde an mit jeweils vier koronalen Gehirnschnitten behafteten Objektträgern von vier bzw. drei Tieren pro Genotyp der Zeitpunkte E14,5 und E18,5 durchgeführt und erfolgte zunächst durch ein Überführen der Objektträger in ein Becherglas mit Ethanol/Eisessig-Lösung für 30 min. Nach kurzem Waschen mit ddH₂O wurden die Schnitte für 5 min in eine Kresylviolettlösung eingetaucht. Im Anschluss an die Wiederholung des vorherigen Waschschrilles fand eine mikroskopische Kontrolle zur Gewährleistung einer optimalen Färbestärke statt. Nachfolgend wurden die Objektträger für jeweils 3 min in eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 95%, zwei mal 100%) sowie Xylol überführt und abschließend mit Entellan[®] eingedeckt.

6.2.2.4 Anfertigung von Immunfluoreszenz-Färbungen

Durch selektive Erkennung von Antigenen mittels hochspezifischer Antikörper können unter Verwendung immunhistochemischer Färbemethoden durch Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählte Strukturen von Gewebeschnitten visualisiert werden. Die immunfluoreszenten Färbungen erfolgten an koronalen Gehirnschnitten von jeweils vier WT und Syndapin III KO Mäusen zum embryonalen Zeitpunkt E14,5 und E18,5. Zur Durchführung der Immunfärbung wurden die tiefgefrorenen und mit maximal fünf murinen Gehirnschnitten versehenen Objektträger zunächst dreimal 10 min mit Oldenburg-Puffer gewaschen. Die Zusammensetzungen der Puffer sowie der Lösungen sind in Abschnitt 6.1.3 aufgeführt. Die anschließende Antigendemaskierung erfolgte, indem die Objektträger in einem Becherglas mit 100 ml Citrat-Puffer, welcher zuvor 1 min in der Mikrowelle erhitzt wurde, auf einer 100°C warmen Heizplatte 30 min inkubierten. Mit diesem Vorgehen können die Auswirkungen der PFA-Fixierung auf das Gewebe verringert und die verlorene Immunreaktivität teilweise wiederhergestellt werden. Nachfolgend wurden die Objektträger mit Oldenburg-Puffer

in Kassetten (Shandon™ Deckplatten) eingespannt, bevor eine drei stündige Inkubation bei RT (Raumtemperatur) mit 300 µl Blockierlösung 1 erfolgte, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren und die Membranpermeabilität zu verbessern. Nach den ersten 90 min erfolgte die Hinzugabe von 300 µl MOM in PBS (1 Tropfen auf 1,25 ml PBS), welches daraufhin die verbliebene Inkubationszeit einwirkte. Anschließend lagerten die Schnitte, versetzt mit den primären Antikörpern, bei 4°C ÜN in 250 µl Blockierlösung 2. Eine Auflistung der primären Antikörper befindet sich mit der jeweiligen Verdünnung in Tabelle 1. Nach erneutem dreimaligen und jeweils zehnteiligen Waschen der Objektträger mit Oldenburg-Puffer erfolgte eine Inkubation der Schnitte von 1 h in 250 µl Blockierlösung 2, versetzt mit den Fluorophor markierten sekundären Antikörpern bzw. DAPI (1:2000). Die verwendeten sekundären Antikörper sowie ihre Verdünnungen sind in Tabelle 2 beschrieben. Abschließend fand wiederum ein dreimaliger zehnteiliger Waschschrift mit dem Oldenburg-Puffer statt, bevor die Objektträger unter Zuhilfenahme von Fluoromount-G® eingedeckt und im Dunkeln bei RT ÜN getrocknet worden sind.

6.2.2.5 Optimierung der Immunfluoreszenz-Färbungen

Zur Erprobung der optimalen immunhistochemischen Färbemethode fanden verschiedene Färbeprotokolle Anwendung. Es wurden zwei Puffer erprobt (Oldenburg-Puffer, Waschpuffer). Die optimale Färbemethode, welche in den Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurde, ist im Abschnitt 6.2.2.4 beschrieben. Die Erprobung des Waschpuffers erfolgte, indem anstatt des Oldenburg-Puffers der Waschpuffer (Zusammensetzung ist in Abschnitt 6.1.3 beschrieben) Anwendung fand. Des Weiteren wurde die Färbung hinsichtlich der Verwendung einer Antigendemaskierung variiert. Dies geschah, indem die Gehirnschnitte entweder, wie in Abschnitt 6.2.2.4 beschrieben, mit dem erhitzten Citrat-Puffer versetzt wurden oder dieser Färbeschritt weggelassen wurde.

6.3 Mikroskopie und Bildanalyse

6.3.1 Hellfeldmikroskopie und morphologische Untersuchung Nissl-gefärbter Gehirnschnitte unter Zuhilfenahme von ImageJ

Die Nissl-gefärbten Kortexabschnitte von vier Mäusen pro Genotyp zum Zeitpunkt E14,5 und drei Mäusen pro Genotyp zum Zeitpunkt E18,5 wurden an dem Imager

D1-Mikroskop unter Verwendung der Zen2 Core *Software* abfotografiert. Für die murinen Gehirnschnitte des Zeitpunkts E14,5 erfolgte die Verwendung eines Objektivs mit 20 x (facher) Vergrößerung und für den Zeitpunkt E18,5 die Verwendung eines Objektivs mit 10 x Vergrößerung. Zu beiden Alterszeitpunkten wurden vier bis fünf Schnitte pro Tier an vier festen Lokalisierungen im Neokortex aufgenommen (lateral, lateromedial, median, medial) (schwarz umrandete Rechtecke in Abb. 5 visualisieren die gewählten abfotografierten Bereiche des Kortex).

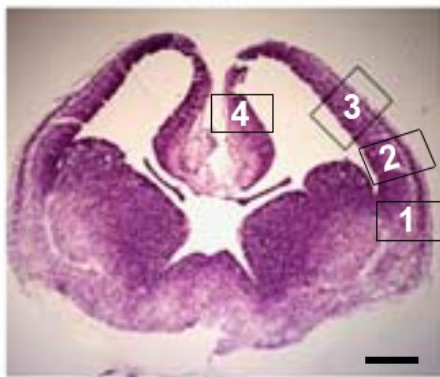


Abb. 5: Übersichtsaufnahme eines Nissl-gefärbten wildtypischen Gehirns. Dargestellt ist repräsentativ ein Nissl-gefärbter koronaler Abschnitt eines wildtypischen Gehirns zum Zeitpunkt E14,5. Die eingezeichneten Rechtecke kennzeichnen die gewählte Lokalisierung der durchgeführten mikroskopischen Aufnahmen. 1: lateral, 2: lateromedial, 3: median 4: medial. Größenbalken: 250 µm. Modifiziert nach Belinson et al. (2016).

Die Charakterisierung des embryonalen Neokortex erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ, welches die Messung der Weite der Kortikalen Platte, der Ventrikularzone sowie der Kortikalen Wand ermöglichte. Anhand dieser Parameter wurde die relative Ausdehnung der Kortikalen Platte sowie der Ventrikularzone, bezogen auf die Kortikale Wand, ermittelt und im Vergleich der Genotypen analysiert. Die Werte der mikroskopisch aufgenommenen Gehirnschnitte wurden erhoben, indem jeweils der im Mittelpunkt des Bildes lokalisierte Bereich der Aufnahme analysiert und die gemessene Ausdehnung des Bildes in Excel-Tabellen exportiert wurde.

6.3.2 Konfokale Mikroskopie und quantitative Analyse fluoreszenzmarkierter Nervenzellen unter Verwendung von ImageJ

Die Aufnahme der immunhistochemisch gefärbten murinen Gehirnschnitte fand mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop unter Verwendung der LAS AF 3 *Software* von Leica statt. Aufgenommen wurden z-Stapel bei maximaler Intensitätsprojektion (MIP) mit einer Ebenendicke von 0,25 µm unter Verwendung eines Objektivs mit 20 x Vergrößerung. Die Geschwindigkeit der Aufnahme betrug 100 Hertz bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln. Der Hintergrund wurde nicht bearbeitet. Die Aufnahmen erfolgten von jeweils vier bis fünf gefärbten Schnitten an drei Stellen im

Kortex (lateral, lateromedial, medial), sodass sich pro Tier 12-15 Bilder ergaben. Ausgewertet wurden vier Mäuse pro Genotyp. Quantitative Bildanalysen erfolgten mit der Bildprozessierungs- und Analysesoftware ImageJ. Als Orientierungshilfe wurde ein Embryo-Histologischer Atlas (*Allen Institut for Brain Science*) herangezogen. Zur fundierten Analyse der Zellanzahl wurde ein Rechteck an einer zentral lokalisierten gut auswertbaren Stelle des Kortex über die gesamte Kortexlänge mit einer Breite von 75 μm in den zuvor erhobenen Aufnahmen gesetzt. Im Bereich dieses Rechtecks wurden anschließend manuell alle mit dem jeweiligen verwendeten Antikörper markierten Zellen ausgezählt. Die Zelldichte wurde zunächst auf die jeweils spezifische errechnete Fläche des ausgewerteten Kortexabschnittes pro Gehirnschnitt gemittelt und abschließend zum Vergleich der Daten auf eine Fläche von 1000 μm^2 bezogen.

6.4 Statistische Auswertung mit GraphPad Prism 8.0

Anhand der mit der Imaris *Software* analysierten Dendritenabschnitte wurden statistische Werte zu Länge und Durchmesser der Dendriten, sowie Anzahl der Dornfortsatzköpfe und somit ihrer Dichte und prozentualen Verteilung zuzüglich Kopfweite, Kopfvolumen und Gesamtlänge jedes einzelnen Dornfortsatzkopfes in Excel-Tabellen übertragen bzw. manuell errechnet. Die Analyse auf statistische Signifikanzen erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 8.0 *Software*. Zunächst wurden alle Daten mit dem *D'Agostino-Pearson-Test* auf eine Gauß'sche Normalverteilung überprüft. Sofern diese vorlag, wurde anschließend ein ungepaarter, zweiseitiger *Student's t-Test* vollzogen. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test. Statistische Signifikanzniveaus wurden mit * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ und n.s.: nicht signifikant gekennzeichnet. Eine detaillierte Auflistung der erhobenen Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Standardfehler des MW (SEM) und n-Werte ist in Tabelle 5 angehängt.

Statistische Signifikanzen der histologischen Charakterisierung des Neokortex anhand der Nissl-gefärbten Aufnahmen sowie der erhobenen Zelldichte mittels immunfluoreszenter Färbungen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 8.0 *Software*, analog zu der beschriebenen Analyse, ermittelt.

7 Ergebnisse

7.1 Auswirkungen der Syndapin III Defizienz auf die dendritischen Dornfortsätze im adulten murinen Kortex

7.1.1 Veränderungen von Dichte und morphologischer Klassenverteilung von dendritischen Dornfortsätzen bei Syndapin III Defizienz

Syndapin I stellt ein wichtiges Adapterprotein während morphologischer Veränderungen und Membrantransportvorgängen neuronaler Zellen dar (Dharmalingam et al. 2009, Koch et al. 2011). Untersuchungen von Syndapin I KO Mausneuronen in Hippocampuschnitten ergaben eine verringerte Dichte von Dornfortsätzen mit ausgebildetem Dornfortsatzkopf und belegtem demnach zusammen mit elektrophysiologischen Untersuchungen postsynaptische Effekte unter Syndapin I Defizienz (Schneider et al. 2014). Syndapin III ist, ebenso wie sein annähernd strukturkonformes Familienmitglied Syndapin I, ein im Gehirn angereichertes Protein (Qualmann et al. 1999). Verhaltensuntersuchungen von Syndapin III KO Mäusen zeigten einen sehr distinkten Phänotyp im sozialen Verhalten sowie Nestbau (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Diese Beobachtungen ließen Störungen in kortikalen Netzwerken der Mäuse vermuten. Da für das Familienmitglied Syndapin I bereits eine Rolle in dendritischen Dornfortsätzen beschrieben ist (Anggono et al. 2013, Schael et al. 2013, Schneider et al. 2014), wurde die Bedeutung von Syndapin III für dendritische Dornen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dafür wurden mikroskopische Aufnahmen Golgi-gefärbter adulter wildtypischer und Syndapin III KO Mausgehirne, welche von Elisa Engelmann (Institut für Biochemie I, UKJ) angefertigt worden sind, in den Untersuchungen dieser Arbeit dreidimensional rekonstruiert und eine Quantifizierung von Dichte, Gestalt und Länge der dendritischen Dornfortsätze vorgenommen (Abb. 6).

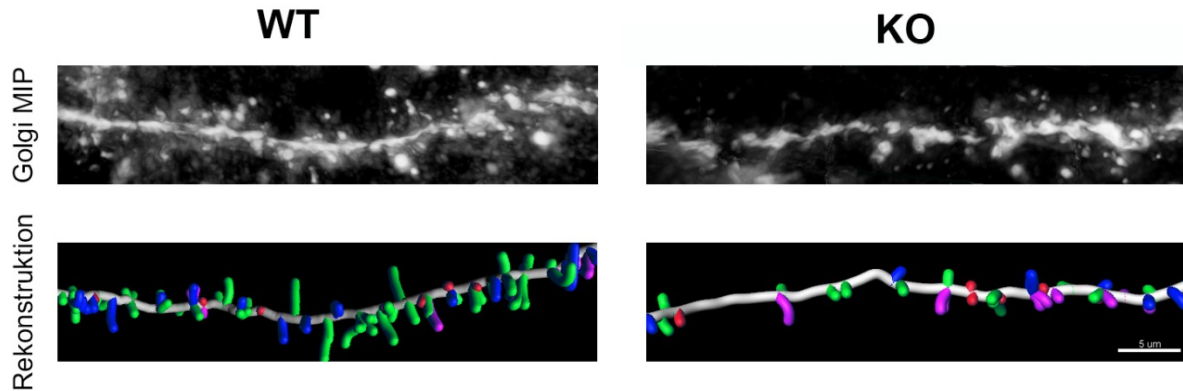


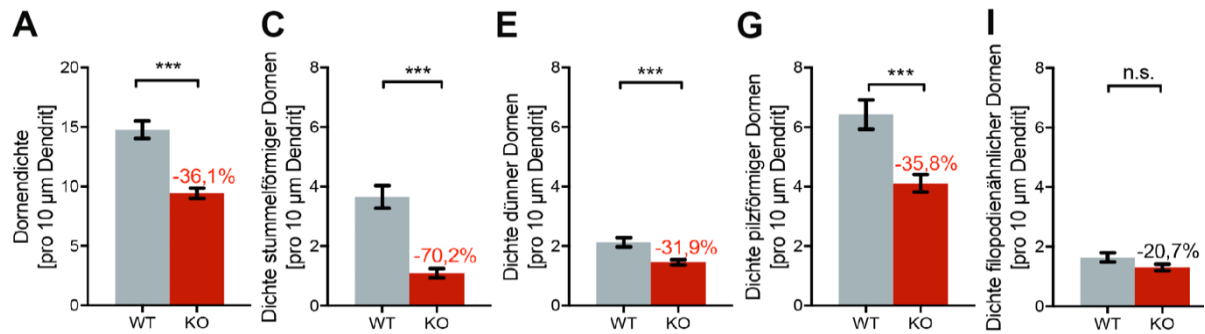
Abb. 6: Golgi MIP mit korrespondierender Dendriten- und Dornfortsatzrekonstruktion. Dargestellt ist beispielhaft an jeweils einem Dendritenabschnitt der kortikalen Schicht V einer wildtypischen und einer Syndapin III KO Maus die MIP von Golgi-gefärbten Pyramidenzellen (obere Abb.) sowie die korrespondierenden Dendriten- und Dornfortsatzrekonstruktionen (untere Abb.) mit der Klassifizierung in die morphologischen Dornfortsatzgruppen: stummelförmige (rot), dünne (blau), pilzförmige (grün) und filopodienähnliche (magenta) Dornen. Größenbalken: 5 µm.

Die Analyse der Dichte der dendritischen Dornen pro 10 µm Dendrit in den kortikalen Schichten II/III und V ergab im Vergleich der Genotypen in Syndapin III KO Mäusen eine signifikant verringerte Gesamtdornendichte um 36,1% (von $14,8 \pm 0,7$ Dornen pro 10 µm im WT auf $9,4 \pm 0,4$ Dornen pro 10 µm im KO; $p < 0,001$) in der Schicht II/III und um 40,9% (von $13,0 \pm 0,6$ Dornen pro 10 µm im WT auf $7,7 \pm 0,5$ Dornen pro 10 µm im KO; $p < 0,001$) in der Schicht V im Vergleich zu WT (Abb. 7A, B). Die Kategorisierung der Dornfortsätze in Morphologiegruppen zeigte eine Reduzierung der Dichte aller kopfhaltigen Dornenklassen (stummförmig, dünn, pilzförmig) bei Syndapin III Defizienz, wobei sich die Dichte stummelförmiger Dornfortsätze am deut-

lichsten vermindert erwies und eine signifikante Reduzierung um 70,2% (von $3,7 \pm 0,4$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im WT auf $1,1 \pm 0,2$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der Schicht II/III und um 58,3% (von $3,6 \pm 0,4$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im WT auf $1,5 \pm 0,2$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der Schicht V im Syndapin III KO im Vergleich zum WT verzeichnete (Abb. 7C, D). Die Analyse dünner und pilzförmiger Dornen ergab ähnliche Regressionen der Dornendichte im Vergleich der Genotypen. Die dünnen Dornen waren im Syndapin III KO verglichen mit WT signifikant um 31,9% (von $2,1 \pm 0,2$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im WT auf $1,5 \pm 0,1$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der Kortexschicht II/III und um 24,5% (von $1,6 \pm 0,1$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im WT auf $1,2 \pm 0,1$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im KO; $p = 0,004$) in der Schicht V reduziert, pilzförmigen Dornen zeigten signifikante Regressionen um 35,8% (von $6,4 \pm 0,5$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im WT auf $4,1 \pm 0,3$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der kortikalen Schicht II/III und um 31,8% (von $5,3 \pm 0,4$ auf $3,6 \pm 0,3$ Dornen pro $10 \mu\text{m}$; $p < 0,001$)

in der Schicht V im Syndapin III KO verglichen mit WT (Abb. 7E-H). Auch die filopodienähnlichen Dornen ließen einen Trend zur Verminderung in der Dichte im Syndapin III KO im Vergleich zum WT verzeichnen, welcher sich statistisch als nicht signifikant und vergleichsweise geringste Abnahme erwies (Abb. 7I, J).

Schicht II/III



Schicht V

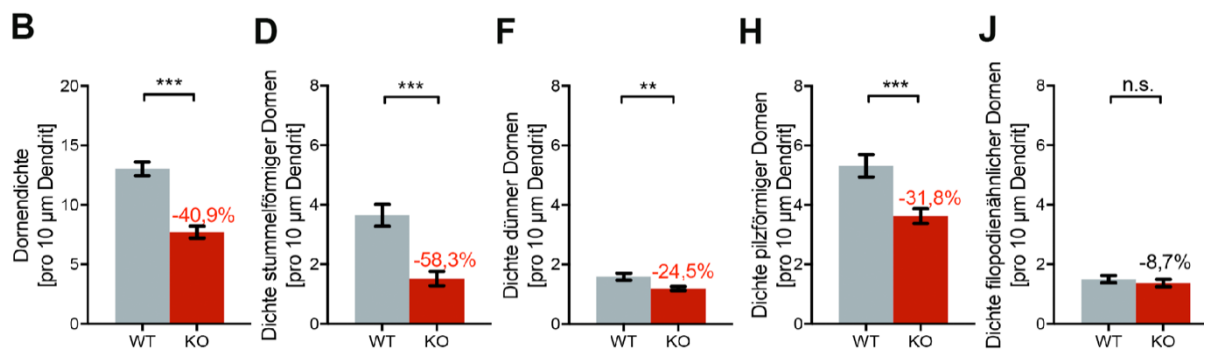


Abb. 7: Syndapin III KO Mäuse zeigten eine signifikante Reduzierung der Dichte der dendritischen Dornfortsätze von Pyramidenzellen in den Kortexschichten II/III und V. Die quantitative Auswertung der Dornfortsatzrekonstruktionen zeigte sowohl eine signifikant reduzierte Gesamtdornendichte (A, B) als auch verringerte Dichten kopfhaltiger Dornfortsatzgruppen (C-H) in den Schichten II/III und V des Neokortex. Filopodienähnliche Dornen wiesen ähnliche Tendenzen auf (I, J). Daten zeigen MW \pm SEM; *Student's t*-Test bei normalverteilten Daten (A, B, E, F, H) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (C, D, G, I, J) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant); drei Mäuse/Genotyp. Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Die Erhebung der prozentualen Verteilung der Morphologiegruppen der Dornfortsätze lies bei Syndapin III-defizienten Mäusen Abweichungen im Vergleich zu WT verzeichnen (Abb. 8A, B). Die Analysen enthüllten bei Syndapin III Defizienz eine Unterrepräsentation insbesondere der stummelförmigen Dornen, welche eine signifikante relative Regression um 47,2% (von $23,9 \pm 2,0\%$ im WT auf $12,6 \pm 1,3\%$ im KO; $p < 0,001$) in der Schicht II/III und um 39,9% (von $27,6 \pm 2,2\%$ im WT auf $16,6 \pm 1,7\%$ im KO; $p < 0,001$) in der Schicht V verzeichnen ließen (Abb. 8C, D). Demgegenüber zeigte sich eine relative Überrepräsentation aller anderen Dornenklassen im Syndapin III KO verglichen mit WT. Während dünne Dornen nicht signifikante Tendenzen

hinsichtlich einer relativen Zunahme bei Syndapin III Defizienz in den untersuchten Schichten aufwiesen (Abb. 8E, F), waren pilzförmige Dornen im Syndapin III KO verglichen mit WT in der relativen Häufigkeit in der Schicht II/III signifikant um 11,0% (von $46,4 \pm 1,6\%$ im WT auf $51,6 \pm 1,6\%$ im KO; $p=0,027$) und in der Schicht V nicht signifikant in geringem Ausmaß erhöht (Abb. 8G, H). Den größten prozentualen Anteil der Dornen im Syndapin III KO ließ die Dornfortsatzvorstufe (filopodienähnliche Dornen) erkennen, welche in der relativen Häufigkeit in Schicht II/III um 28,0% (von $12,8 \pm 1,2\%$ im WT auf $16,4 \pm 1,1\%$ im KO; $p=0,006$) sowie in Schicht V um 41,7% (von $13,3 \pm 1,1\%$ im WT auf $18,9 \pm 1,4\%$ im KO; $p=0,002$) im Vergleich zu WT überrepräsentiert war (Abb. 8I, J).

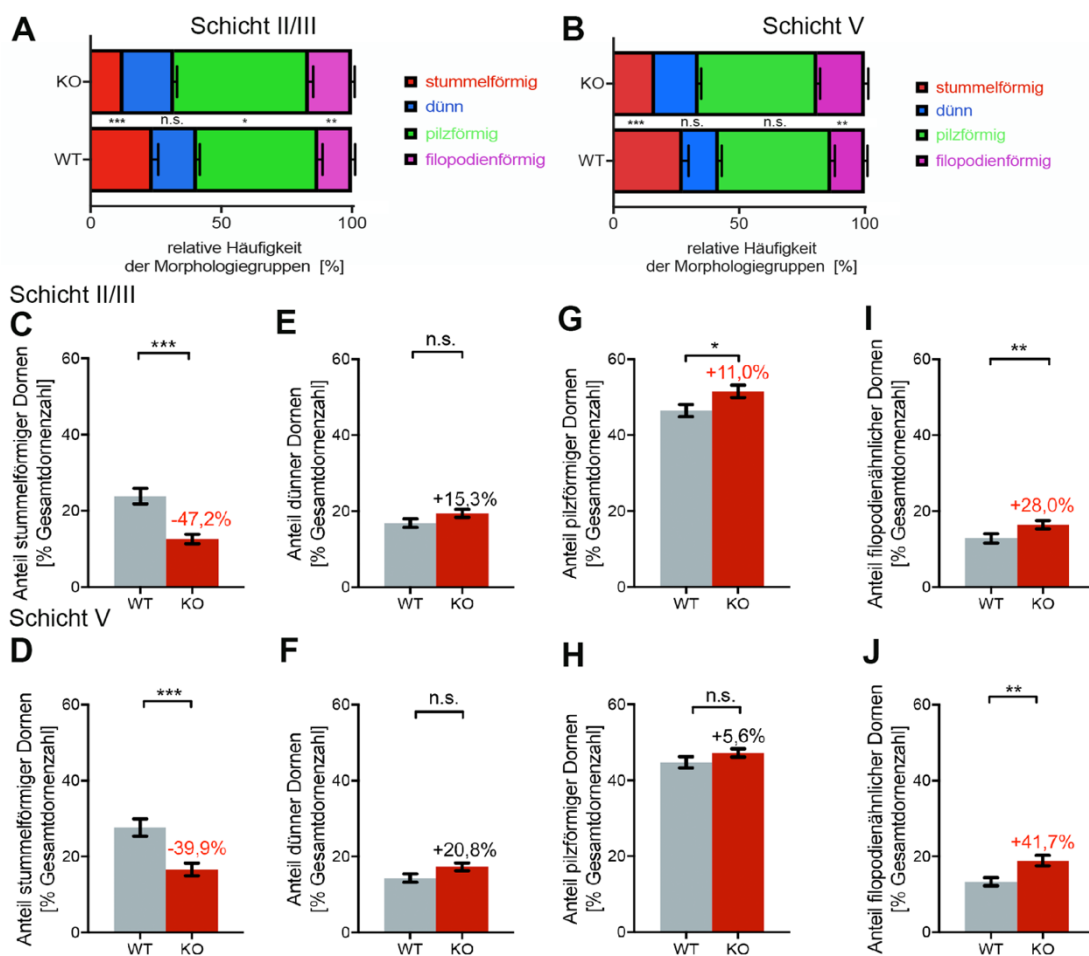


Abb. 8: Syndapin III KO Mäuse trugen verglichen mit WT anteilig mehr unreife dendritische Dornfortsätze auf ihren kortikalen Dendriten der Schichten II/III und V. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der einzelnen Morphologiegruppen an der Gesamtdornenzahl in den kortikalen Schichten II/III (A) und V (B). Die statistische Analyse der prozentualen Verteilung der Morphologiegruppen ergab einen verminderten Anteil stummelförmiger Dornen (C, D) sowie Tendenzen zu einer Progression aller anderen Dornengruppen (E-J). Eine signifikante Zunahme zeigten pilzförmige Dornen der Schicht II/III (G) sowie filopodienähnliche (unreife) Dornfortsätze beider ausgewerteter Schichten (I, J) in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT. Daten zeigen MW \pm SEM; *Student's t*-Test bei normalverteilten Daten (F, H, J) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (C, D, E, G, I) (* $p<0,5$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; n.s.: nicht signifikant); drei Mäuse/Genotyp. Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Diese Ergebnisse wiesen auf eine Verringerung der kortikalen Dornendichte (Abb. 7) sowie eine veränderte prozentuale Verteilung der Morphologiegruppen (Abb. 8) bei Syndapin III Defizienz hin. Insbesondere waren die reiferen Dornenklassen mit Fokus auf die Morphologiegruppe mit der geringsten Dornenlänge (stummelförmige Dornen) betroffen. Überdies konnte eine relative Überrepräsentation der unreiferen filopodienähnlichen Dornfortsatzvorstufe im Syndapin III KO verglichen mit WT registriert werden.

Entgegen der detektierten erhöhten relativen Häufigkeit der reifen pilzförmigen sowie dünnen Dornen kam es zusammengenommen, im Vergleich der Genotypen, aufgrund der gravierenden Reduzierung der Dornendichte zu einer Regression reifer Dornen im Syndapin III KO. Die quantitativen Beobachtungen der dendritischen Dornfortsätze legten einen Einfluss von Syndapin III auf Dornfortsätze aller Klassen nahe. Infolgedessen stellte sich die Frage, warum insbesondere stummelförmige Dornen betroffen waren. Um ergänzend zu diesen Analysen weitere Erkenntnisse über mögliche Abweichungen in der Dornenreifung zu ermitteln, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Dornengestalt des postsynaptischen Kompartiments einschließlich der Dornenköpfe sowie Dornenlängen untersucht.

7.1.2 Analyse der Dornenmorphologie dendritischer Dornfortsätze im murinen Neokortex von WT und Syndapin III KO Mäusen

In den Analysen zur Morphologie des postsynaptischen Kompartiments wurden Kopfweite, Kopfvolumen und Dornenlänge der einzelnen Klassen analysiert. Pilzförmige Dornen zeichnen sich durch einen voluminösen, kugeligen Kopf und schmalen Hals aus, wohingegen dünne Dornen kleinere, klar abgesetzte Köpfe und einen schlanken, langen Hals besitzen (Harris et al. 1992). Stummelförmige Dornen weisen keine offensichtliche Konstriktion zwischen ihrem kurzen Kopf und dem dendritischen Schaft auf, besitzen ergo keine klare Abgrenzung zwischen Kopf und Hals sowie nur geringe Dornenlängen (Bellot et al. 2014) (Tabelle 3 Methodik für exakte Klassifizierung). Die Quantifizierung der Kopfweite ergab zusammengenommen für die drei kopfhaltigen Morphologiegruppen im Syndapin III KO verglichen mit WT eine statistisch signifikante Verringerung um 3,3% (von $0,639 \pm 0,003 \mu\text{m}$ im WT auf $0,618 \pm 0,004 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der Schicht II/III (Abb. 9A) und nicht signifikante Tendenzen zu einer Abnahme in der Schicht V (Abb. 9B). Stummelförmige Dornen verzeichneten im Syndapin III KO im Vergleich zu WT keine signifikanten Veränderun-

gen in den Schichten II/III und V (Abb. 9C, D), wohingegen dünne Dornen eine signifikante Reduktion um 3,9% (von $0,414 \pm 0,002 \mu\text{m}$ im WT auf $0,398 \pm 0,003 \mu\text{m}$ im KO; $p=0,01$) in der Schicht II/III (Abb. 9E) aufwiesen und keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Schicht V zeigten (Abb. 9F). Die deutlichste Verringerung der Kopfweite wiesen die reifen pilzförmigen Dornen auf. Diese waren im Syndapin III KO im Vergleich zu WT statistisch signifikant um 4,7% (von $0,729 \pm 0,004 \mu\text{m}$ im WT auf $0,695 \pm 0,005 \mu\text{m}$ im KO; $p<0,001$) (Abb. 9G) in der Schicht II/III sowie um 2,2% (von $0,758 \pm 0,004 \mu\text{m}$ im WT auf $0,741 \pm 0,005 \mu\text{m}$ im KO; $p=0,01$) in der Schicht V reduziert (Abb. 9H). Zur genaueren Analyse der Kopfgröße wurde weiterführend auch das Kopfvolumen untersucht. Die Kopfvolumina verzeichneten in den drei untersuchten kopfhaltigen Dornenklassen im Syndapin III KO verglichen mit WT summarisch eine signifikante Verminderung in der Schicht II/III um 12,4% (von $0,186 \pm 0,005 \mu\text{m}^3$ im WT auf $0,163 \pm 0,003 \mu\text{m}^3$ im KO; $p<0,001$) (Abb. 9I) sowie keine signifikanten Veränderungen in der Schicht V (Abb. 9J). Stummelförmige Dornen zeigten im Syndapin III KO verglichen mit WT in der Schicht II/III tendenziell eine Zunahme (Abb. 9K) sowie in der Schicht V gegenläufig geringfügige nicht signifikante Tendenzen zu einer Abnahme (Abb. 9L). Das Kopfvolumen dünner Dornen zeigte eine Reduktion um 31,8% (von $0,088 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$ im WT auf $0,060 \pm 0,001 \mu\text{m}^3$ im KO; $p=0,04$) mit statistischer Signifikanz in der Schicht II/III im Syndapin III KO verglichen mit WT (Abb. 9M), hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Schicht V (Abb. 9N). Pilzförmige Dornfortsätze ließen im Syndapin III KO im Vergleich zu WT reduzierte Kopfvolumina um 21,3% (von $0,277 \pm 0,008 \mu\text{m}^3$ im WT auf $0,218 \pm 0,004 \mu\text{m}^3$ im KO; $p=0,001$) mit statistischer Signifikanz in der Schicht II/III (Abb. 9O) sowie eine statistisch nicht signifikante Regression in der Schicht V verzeichnen (Abb. 9P).

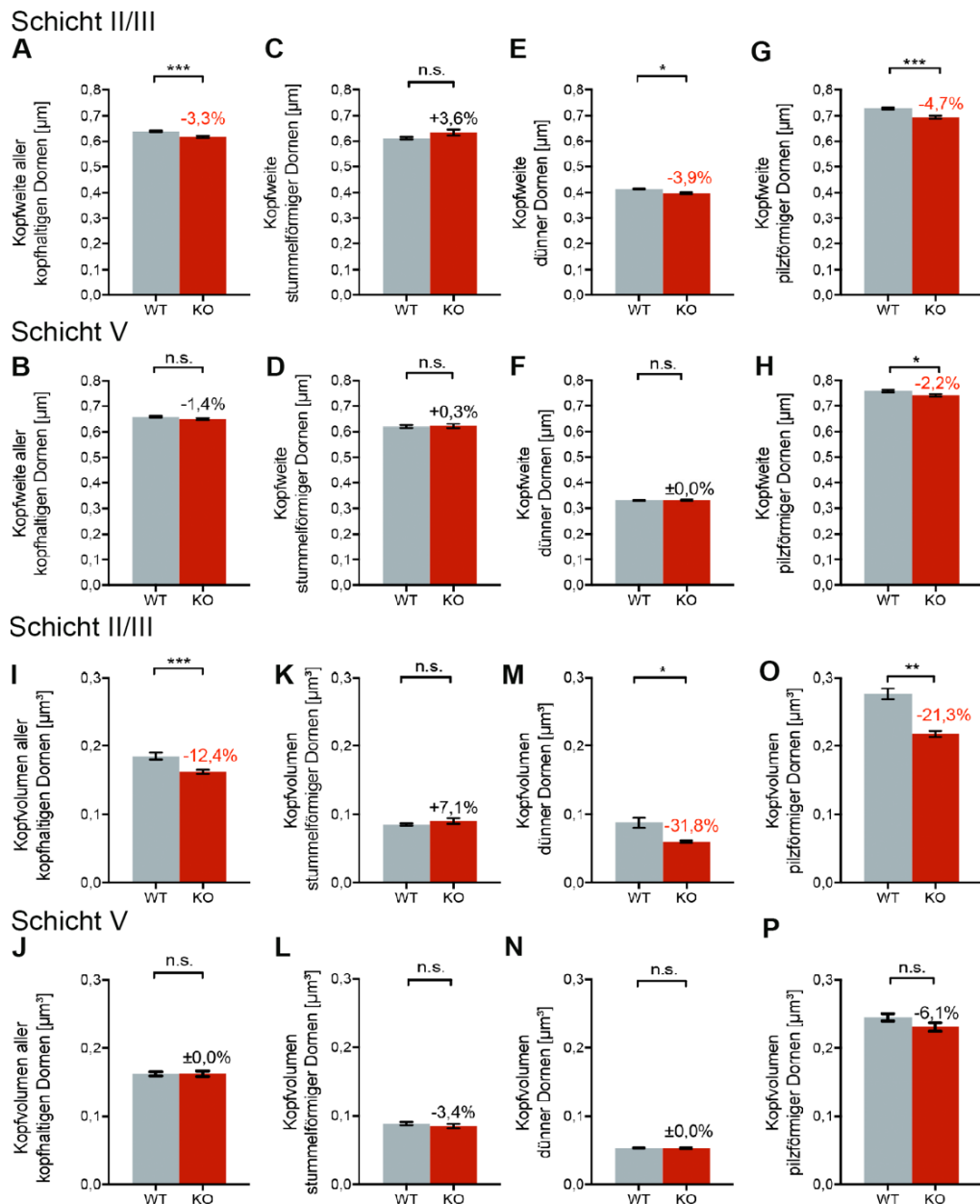
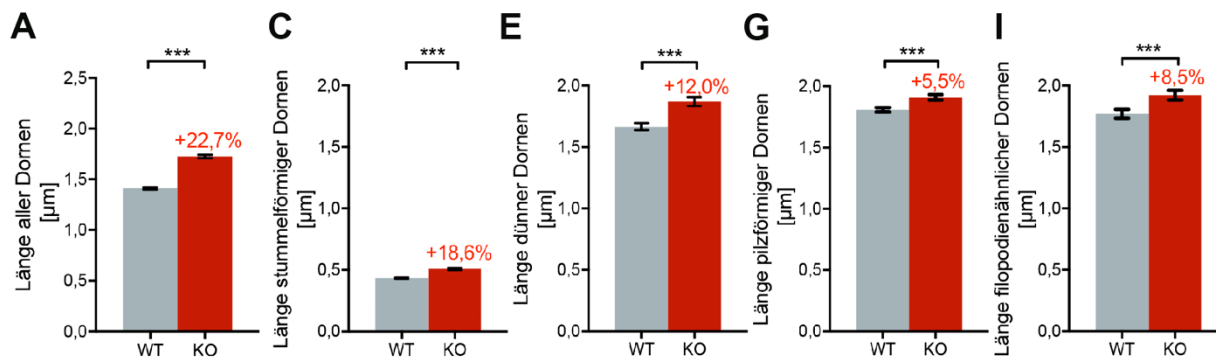


Abb. 9: Syndapin III Defizienz führte zu einer veränderten Konstitution der dendritischen Dornenköpfe in kortikalen Pyramidenzellen der Schichten II/III und V. Dargestellt ist die statistische Auswertung der morphologischen Veränderungen der Dornfortsatzrekonstruktionen in WT und Syndapin III KO Mäusen in den Kortexschichten II/III und V. Bei Syndapin III Defizienz kam es zu einer Abnahme der Gesamtkopfweite (A) in der Schicht II/III und zu nicht signifikanten Veränderungen in der Schicht V (B). Während stummelförmige Dornen in den untersuchten Schichten keine signifikanten Veränderungen der Kopfweite zeigten (C, D), verzeichneten dünne Dornen in der Schicht II/III eine signifikante Reduzierung (E) sowie in der Schicht V keine signifikanten Veränderungen (F). Die Kopfweite pilzförmiger Dornen war in den Schichten II/III und V signifikant reduziert (G, H). Die Kopfvolumina kopfhaltiger Dornen der Syndapin III KO Mäuse zeigten summarisch in den Schichten II/III eine Reduzierung (I) sowie keine signifikanten Veränderungen in Schicht V (J). Stummelförmige Dornen ließen keine signifikanten Abweichungen verzeichnen (K, L). Während die Kopfvolumina dünner Dornen der Schicht II/III vermindert waren (M), wiesen sie in der Schicht V keine signifikanten Veränderungen auf (N). Pilzförmigen Dornen zeigten eine signifikante Verminderung der Kopfvolumina in der Schicht II/III (O), hingegen nur Tendenzen zu einer Reduzierung der Dornen in Schicht V (P). Daten zeigen MW \pm SEM; Daten waren nicht normalverteilt, woraufhin ein Mann-Whitney-Test durchgeführt wurde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant); drei Mäuse/Genotyp. Die MW, SD, SEM und n -Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Zusammengenommen zeigten sich bei Syndapin III Defizienz insbesondere in der Schicht II/III Auswirkungen auf die Dornenmorphologie. Es konnte in den reiferen pilzförmigen Dornen mit voluminösen Kopf und den dünnen Dornfortsätzen der Schicht II/III eine deutliche Reduzierung der Kopfweite und Kopfvolumina mit statistischer Signifikanz im Syndapin III KO verglichen mit WT detektiert werden.

Da es während der Reifung dendritischer Dornen für gewöhnlich zu einer Verringerung in der Anzahl filopodienähnlicher Dornfortsätze, einer Zunahme der Kopfgröße und auch zu einer Verkürzung der Dornenlänge kommt, wurde, um die Reifungsprozesse umfassend zu analysieren, abschließend die Dornenlänge untersucht. Im Syndapin III KO kam es verglichen mit WT zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Dornen aller Morphologiegruppen in der Kortexschicht II/III um 22,7% (von $1,41 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im WT auf $1,73 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) sowie in Schicht V um 18,5% (von $1,35 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im WT auf $1,60 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) (Abb. 10A, B). Bezogen auf die individuellen Morphologiegruppen ließen die stummelförmigen Dornen der Schicht II/III die gravierendste Elongation verzeichnen. Detektiert wurde eine Verlängerung um 18,6% im Syndapin III KO verglichen mit WT (von $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im WT auf $0,51 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) (Abb. 10C). In der Kortexschicht V zeigten stummelförmige Dornen hingegen eine Abnahme der Dornenlänge mit statistischer Signifikanz um 4,4% im Syndapin III KO verglichen mit WT (von $0,45 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im WT auf $0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ im KO; $p = 0,02$) (Abb. 10D). Dünne Dornen waren statistisch signifikant um 12,0% (von $1,67 \pm 0,03 \mu\text{m}$ im WT auf $1,87 \pm 0,04 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in der Kortexschicht II/III im Syndapin III KO im Vergleich zu WT verlängert (Abb. 10E). Ähnliche Tendenzen dünner Dornen ohne Signifikanz zeigten sich in der Schicht V (Abb. 10F). Statistisch signifikante Ergebnisse konnten auch bei pilzförmigen Dornen verzeichnet werden. Diese Morphologiegruppe ließ eine Verlängerung um 5,5% (von $1,81 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im WT auf $1,91 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in Schicht II/III und um 8,5% (von $1,76 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im WT auf $1,91 \pm 0,02 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in Schicht V im Syndapin III KO verglichen mit WT detektieren (Abb. 10G, H). Auch filopodienähnliche Dornen waren statistisch signifikant um 8,5% (von $1,77 \pm 0,04 \mu\text{m}$ im WT auf $1,92 \pm 0,04 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in Schicht II/III und um 11,9% (von $1,76 \pm 0,03 \mu\text{m}$ im WT auf $1,97 \pm 0,04 \mu\text{m}$ im KO; $p < 0,001$) in Schicht V im Syndapin III KO im Vergleich zu WT verlängert (Abb. 10I, J).

Schicht II/III



Schicht V

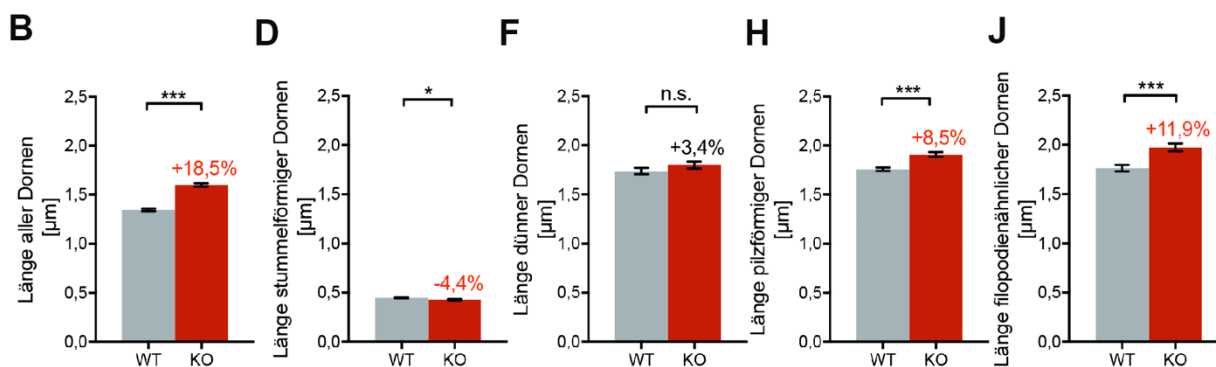


Abb. 10: Syndapin III KO Mäuse wiesen im Vergleich mit WT Veränderungen in der Länge dendritischer Dornfortsätze in Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen des Kortex auf. Dargestellt ist die statistische Auswertung der Dornfortsatzlängen in kortikalen Dendriten der Schichten II/III und V in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT. In den Schichten II/III und V wurde zusammengenommen eine statistisch signifikante Elongation der Dornenlänge detektiert (A, B). Ferner konnten statistisch signifikante Verlängerungen jeder einzelnen Dornenklasse mit Ausnahme der stummelförmigen und dünnen Dornen in Schicht V detektiert werden (C-J). Daten zeigen MW ± SEM; Daten waren nicht normalverteilt, woraufhin ein Mann-Whitney-Test durchgeführt wurde (* p<0,05; ***p<0,001; n.s.: nicht signifikant); drei Mäuse/Genotyp. Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Syndapin III Defizienz in der kortikalen Schicht II/III zu einer Verlängerung jeder einzelnen Dornenklasse führt. In der Schicht V ließ sich im Syndapin III KO im Vergleich zu WT eine Elongation bei den pilzförmigen und filopodienähnlichen Dornen verzeichnen, dünne Dornen zeigten ähnliche Tendenzen ohne statistische Signifikanz.

Die Detektierung der Effekte auf die Kopfgröße sowie auf die Dornenlänge dendritischer Dornfortsätze im Syndapin III KO sprach neben dem Einfluss von Syndapin III auf Dichte und prozentuale Verteilung dendritischer Dornen auch für eine Involvement in die Reorganisation der Dornfortsatzmorphologie. Insgesamt resultierte die Syndapin III Defizienz in einer Verringerung der Dichte reifer Dornen, einer prozentualen relativen Überrepräsentation unreifer Dornen, einer verringerten Kopfgröße pilz-

förmiger und dünner Dornen in Schicht II/III sowie einer Dornenverlängerung in fast allen Morphologiegruppen.

7.2 Auswirkungen der Syndapin III Defizienz auf die murine kortikale Embryonalentwicklung

7.2.1 Analyse der embryonalen kortikalen Organisation im Vergleich beider Genotypen

In der vorangegangenen Analyse wurden bereits postsynaptische Funktionen von Syndapin III in 20 Wochen alten Mäusen und somit ein Einfluss von Syndapin III auf die komplexe Architektur des zerebralen Kortex zu adulten Zeitpunkten beschrieben. Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auch zu embryonalen Zeitpunkten bestätigt werden kann. Da bis dato putative Funktionen von Syndapin III in der Embryonalentwicklung unbekannt waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit embryonale Untersuchungen durchgeführt. Eine mögliche Ursache für die Verhaltensabweichungen adulter Syndapin III KO Mäuse (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ) könnten transiente und dennoch für den adulten Zustand prägende Veränderungen in der kortikalen Entwicklung darstellen. In der Literatur wurde der Tag E14,5 als kritischer Zeitpunkt für die korrekte Ausbildung von sozialem Verhalten beschrieben (Belinson et al. 2016). Auf Grund dessen erfolgte die Analyse struktureller Veränderungen der murinen Großhirnrinde, welche mittels Nissl-gefärbter koronaler Gehirnschnitte (Übersichtsaufnahme Abb. 5) von embryonalen Tieren beider Genotypen zum Tag E14,5 sowie zum Zeitpunkt E18,5 durchgeführt wurde. Diese Untersuchung ermöglichte die Detektierung signifikanter Unterschiede in der relativen Ausdehnung der Kortikalen Platte bezogen auf die Kortikale Wand (Abb. 11A-D für repräsentative Färbungen in beiden Genotypen). Die Expansion der Kortikalen Platte, bezogen auf die Kortikale Wand, zeigte im Vergleich der Genotypen bei Syndapin III Defizienz einen Anstieg um 14,3% (von $0,14 \pm 0,01$ im WT auf $0,16 \pm 0,01$ im KO; $p < 0,001$) (Abb. 11E). Überdies ließ die Charakterisierung des Neokortex zum Zeitpunkt E14,5 im Syndapin III KO verglichen mit WT Tendenzen zu einer relativen Expansion der Ventrikularzone, welche die statistische Signifikanz knapp verfehlten ($p = 0,05$), bei tendenziell ähnlicher Breite der Kortikalen Wand ohne statistische Signifikanz detektieren (Abb. 11F, G). Zum Zeitpunkt E18,5 zeigten die histologischen Analysen Syndapin III-defizienter Mäuse im Vergleich zu WT entgegengesetzt eine verminderte Ausdehnung der Kortikalen Platte, bezogen auf die Kortikale Wand, um 14,0% (von $0,43 \pm 0,02$ im WT auf $0,37 \pm 0,02$ im KO;

$p=0,01$) (Abb. 11H). Als knapp statistisch nicht signifikant ($p=0,07$) erwies sich die Analyse des relativen Anteils der Ventrikularzone, welcher in Syndapin III KO Mäusen Tendenzen zu einer Verminderung zeigte (Abb. 11I). Die Ausdehnung der Kortikalen Wand verzeichnete überdies zum Zeitpunkt E18,5 nur geringfügige Unterschiede im Vergleich der Genotypen ohne statistische Signifikanz (Abb. 11J). Eine ergänzende Auswertung der absoluten Ausdehnung der Kortikalen Platte und Ventrikularzone, ohne Relation zur Kortikalen Wand, ist als Abb. 20 angehängt.

E14,5

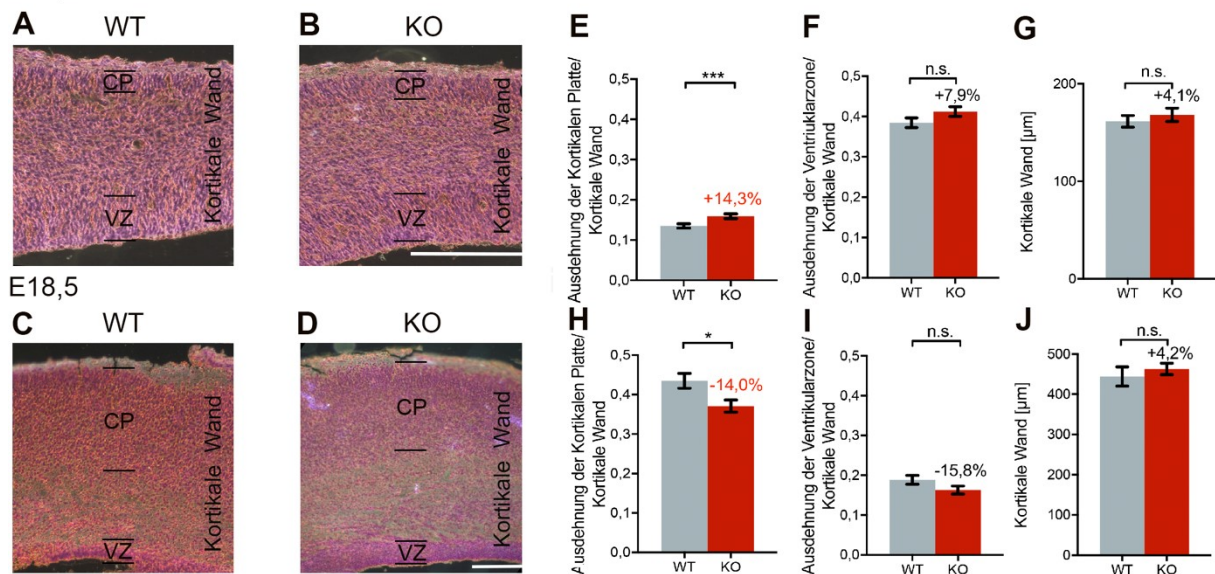


Abb. 11: Nissl-Färbungen zur Analyse der Organisation des embryonalen Kortex. Dargestellt sind beispielhafte Färbungen zur histologischen Charakterisierung des Kortex zu den Zeitpunkten E14,5 (A, B) und E18,5 (C, D) im WT und Syndapin III KO. Überdies ist die statistische Auswertung der relativen Ausdehnung der Kortikalen Platte (CP) sowie Ventrikularzone (VZ) und Kortikalen Wand visualisiert. Im Vergleich der Genotypen wurde zum embryonalen Zeitpunkt E14,5 eine relative Expansion der CP (E) sowie Tendenzen zu einer relativ erhöhten Ausdehnung der VZ (F), bei tendenziell nahezu unveränderter Breite der Kortikalen Wand (G), detektiert. Bei Syndapin III Defizienz war zum Zeitpunkt E18,5 die relative Ausdehnung der CP im Vergleich zu WT vermindert, während die VZ Tendenzen zu einer relativen Abnahme zeigte (H, I). Die Kortikale Wand wies keine signifikanten Veränderungen im Vergleich der Genotypen auf (J). Größenbalken: 100 μm . Daten zeigen MW \pm SEM; *Student's t*-Test bei normalverteilten Daten (I) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (E, F, G, H, J) (* $p<0,01$; *** $p<0,001$; n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5); drei Mäuse/Genotyp (E18,5). Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

7.2.2 Analyse der Dichte kortikaler Neurone embryonaler WT und Syndapin III KO Mäuse

7.2.2.1 Methodische Optimierung der immunhistochemischen Färbung

An hellfeldmikroskopische Untersuchungen anschließende immunhistochemische Analysen dienen der Aufklärung der Frage, ob die in Syndapin III KO Mäusen detek-

tierte Expansion der Kortikalen Platte, bezogen auf die Kortikale Wand, zum Zeitpunkt E14,5 und die konträre Reduzierung der Ausdehnung der Kortikalen Platte zum Zeitpunkt E18,5 mit einer veränderten Proliferation oder Differenzierung kortikaler Vorläuferzellen bzw. Neuronen im Zusammenhang stehen. Um mögliche Abweichungen in der Quantität der Vorläuferzellen sowie der Neurone verschiedener Kortexschichten in embryonalen Syndapin III KO Mäusen zu ermitteln, wurden, ergänzend zu den histologischen Analysen des Neokortex mittels Nissl-Methode, Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Marker von Vorläuferzellen und Neuronen verschiedener Kortexschichten zu den Zeitpunkten E14,5 und E18,5 durchgeführt. Die gleichen Zeitpunkte wurden auch zur Analyse der Organisation des Neokortex herangezogen. Zur Etablierung der Immunfärbungen erfolgte eine Erprobung von Färbevarianten unter Verwendung mehrerer primärer Antikörper zur Markierung von Vorläuferzellen und von diversen Schichtenmarkern. Bei Verwendung verschiedener Puffer und des zusätzlichen Gebrauchs eines Citrat-Puffers zur Antigendemaskierung zeigten sich divergierende Färbesignale. Es erfolgte ein Vergleich von vier Testserien. Unter jeweiliger Verwendung eines Vorläuferzellmarkers Sox2, eines Markers der postnatalen hohen Kortexschichten Cux1 und eines Markers der postnatalen tiefen Kortexschichten Ctip2 wurden die murinen Gehirnschnitte gefärbt. Die Anwendung des Oldenburg-Puffers zeigte das bessere Färbeergebnis in den Testfärbungen. Darüber hinaus resultierte die zusätzliche Verwendung einer Antigendemaskierung in einem deutlicheren Detektionssignal. Alle Testserien wurden gleichermaßen behandelt. Die visuelle Bewertung der unterschiedlichen Methoden nach Aufnahme am konfokalen Lasermikroskop zeigte ergo bei allen drei verwendeten Markern unter Verwendung des Oldenburg-Puffers und der Verwendung des Citrat-Puffers zur Antigendemaskierung optimale Ergebnisse. Dementsprechend erfolgte die Färbung der murinen Gehirnschnitte der vorliegenden Arbeit gemäß des in Abschnitt 6.2.2.4 beschriebenen Färbeprotokolls.

7.2.2.2 Analyse der Dichte DAPI+ (positiver) Zellen im Kortex beider Genotypen

Die vergleichende Analyse der Zelldichte im Kortex gefärbter Gehirnschnitte zum Zeitpunkt E14,5 ergab unter Anwendung des Markers DAPI ähnliche Zelldichten in beiden Genotypen ohne signifikante Unterschiede (Abb. 12A). Zum Tag E18,5 zeigte sich im Syndapin III KO im Vergleich zu WT ein geringfügiger Anstieg der Dichte DAPI+ Zellen um 2,1% (von $11,5 \pm 0,2$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $11,7 \pm 0,2$ Zellen/

1000 μm^2 im KO; $p=0,017$) mit statistischer Signifikanz (Abb. 12B). Demzufolge konnte eine annähernd gleiche Zelldichte während der Embryonalentwicklung im WT und Syndapin III KO angenommen werden. In den folgenden Untersuchungen wurde die Analyse immunhistochemisch markierter Zellen auf die jeweils ausgewertete Fläche bezogen. Eine alternative Quantifizierung der Zelldichte erfolgte, indem die Anzahl der vom jeweiligen Antikörper gefärbten Zellen auf die Gesamtzahl DAPI+ Zellen im ausgewerteten Kortextbereich bezogen wurde. Diese Analyse ist als Abb. 21 angehängt.

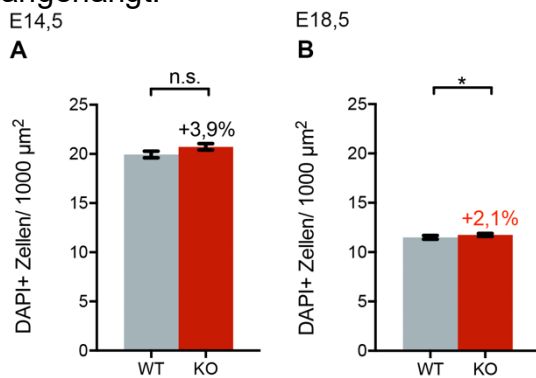


Abb. 12: Immunfluoreszenz Analyse der Gesamtzellendichte unter Verwendung von DAPI.

Dargestellt ist die statistische Auswertung der DAPI-gefärbten Zellkerne, welche Tendenzen zu einer ähnlichen Zelldichte zum Zeitpunkt E14,5 ohne statistische Signifikanz (A) bzw. einen geringfügigen signifikanten Anstieg zum Zeitpunkt E18,5 (B) verzeichneten. Daten zeigen MW \pm SEM; Daten waren nicht normalverteilt, woraufhin ein Mann-Whitney-Test durchgeführt wurde (* $p<0,5$; n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und n -Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

7.2.2.3 Analyse von Tbr2+ und Sox2+ Zellen im Vergleich der Genotypen

Die neuroepithelialen Zellen, die als Ursprung aller kortikaler Neurone gelten, teilen sich vorwiegend in die Sox2+ Radialgliazellen, welche sich größtenteils wiederrum in Tbr2+ Intermediärgliazellen differenzieren (repräsentative Färbungen in beiden Genotypen Abb. 13A-D) (Hevner et al. 2006, Molyneaux et al. 2007). Diese Gliazellen stellen die Vorläuferzellen zukünftiger Neurone dar (Lui et al. 2011). Während ihrer Differenzierung durchlaufen die Neurone mehrere Etappen. Radialgliazellen reifen zu Intermediärgliazellen, die nicht mehr die Morphologie der Radialgliazellen besitzen, jedoch weiterhin ihre Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sox2, exprimieren und somit von beiden verwendeten Antikörpern Sox2 und Tbr2 angefärbt werden. Diese Intermediärgliazellen entwickeln sich anschließend zu reiferen Intermediärgliazellen, die spezifische Marker der Radialgliazellen nicht mehr exprimieren und darauffolgend in unreife Neurone (Lui et al. 2011). Die Analyse der Dichte der Tbr2+ Intermediärgliazellen erfolgte mittels mikroskopischer Aufnahmen an drei Stellen des Kortex (lateral, lateromedial, medial) unter Auszählung der vom Antikörper markierten Zellen innerhalb eines für die Auswertung geeigneten, zentral in die Aufnahme platzierten Rechtecks. Die ermittelte Zellzahl wurden auf die jeweils pro Gehirnschnitt

spezifisch errechnete Fläche des ausgewerteten Bereichs des Kortex und zum besseren Vergleich der Daten auf eine Fläche von $1000 \mu\text{m}^2$ bezogen. Die Quantifizierung der Zellen zeigte in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT zum Zeitpunkt E14,5 eine statistisch signifikante Reduzierung der Zelldichte Tbr2+ Zellen um 14,7% (von $2,9 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $2,4 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO; $p < 0,001$) (Abb. 13E). Zum Zeitpunkt E18,5 konnte gegenläufig ein signifikanter Anstieg der Dichte Tbr2+ Zellen um 52,5% (von $1,8 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $2,8 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO; $p < 0,001$) im Syndapin III KO im Vergleich zu WT ermittelt werden (Abb. 13F). Sox2+ Radialgliazellen wiesen zum Tag E14,5 bezüglich ihrer Dichte bei Syndapin III Defizienz nicht signifikante Tendenzen zu einer Abnahme auf (Abb. 13G). Zum Zeitpunkt E18,5 konnte gegenläufig eine Zunahme Sox2+ Zellen um 38,9% (von $1,4 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $1,9 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO, $p < 0,001$) im Syndapin III KO verglichen mit WT detektiert werden (Abb. 13H). Sichtbar zu den untersuchten Zeitpunkten ist, dass ein Teil der Zellen von beiden Antikörpern markiert wird und somit Sox2+/Tbr2+ ist (Abb. 13A-D). Diese doppelt gefärbten Zellen wurden in beiden Genotypen detektiert und in Analysen von Belinson et al. (2016) als basal im Kortex lokalisierte Vorläuferzellpopulation beschrieben (Belinson et al. 2016). Zwischenstufen in der Entwicklung von Radialgliazellen und Intermediärgliazellen exprimieren Transkriptionsfaktoren beider Gliazellarten (Lui et al. 2011) und bedingen somit teilweise eine doppelte Auswertung von Vorläuferzellen in dieser Arbeit in der Sox2 sowie in der Tbr2 Färbung.

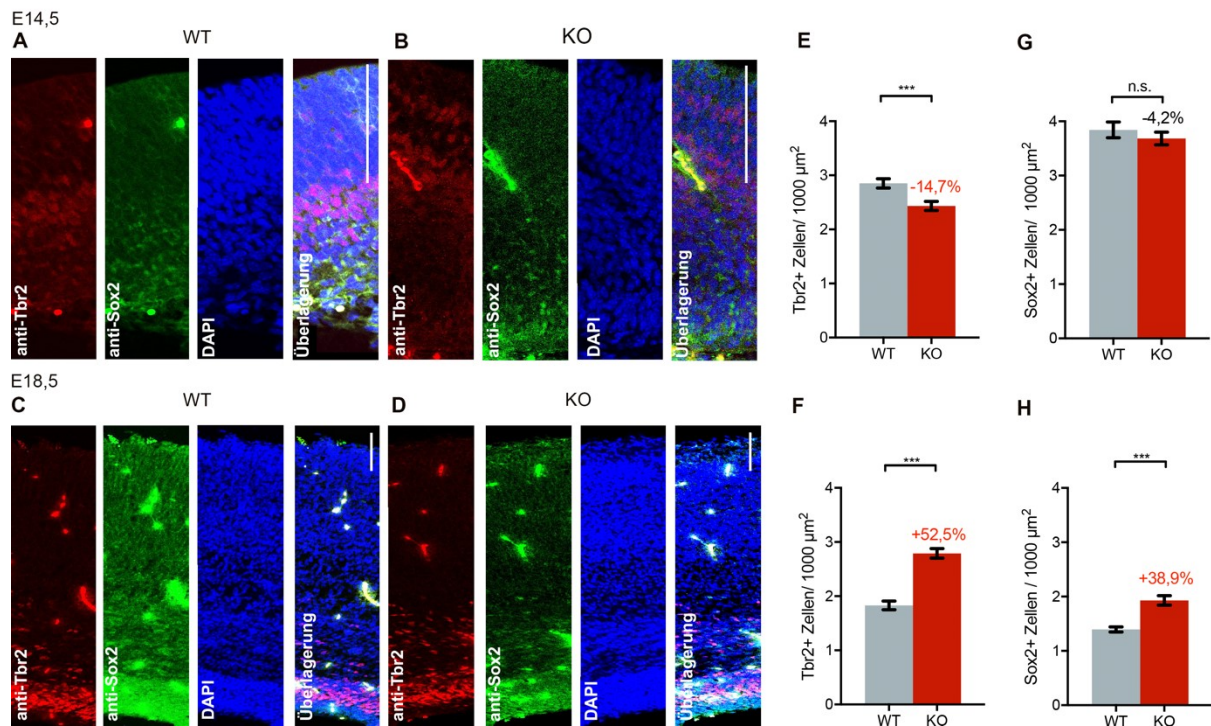


Abb. 13: Immunhistochemische Untersuchungen von Pyramidenzellen des Neokortex mit den Markern Tbr2 und Sox2 zu embryonalen Zeitpunkten. Dargestellt sind beispielhafte Färbungen unter Verwendung der Vorläuferzellmarker Tbr2 (rot) und Sox2 (grün) von jeweils einem Kortexabschnitt im WT und Syndapin III KO. Weiterhin sind DAPI+ Zellen (blau) sowie die Überlagerung der Färbungen visualisiert (**A-D**). Ferner ist die statistische Auswertung der Dichte der Tbr2+ (**E, F**) sowie Sox2+ (**G, H**) Vorläuferzellen zu den embryonalen Zeitpunkten E14,5 und E18,5 abgebildet. Während die Dichte Tbr2+ Vorläuferzellen zum früheren Untersuchungszeitpunkt im Syndapin III KO vermindert war (**E**) bzw. die Dichte Sox2+ Vorläuferzellen keine signifikanten Veränderungen zeigte (**G**), verzeichnete die Dichte beider Vorläuferzellarten zum Zeitpunkt E18,5 einen Anstieg (**F, H**). Größenbalken: 100 μm. Stark angefärbte Bereiche mit abweichender Morphologie von den übrigen Zellen stellen Erythrozyten dar und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Daten zeigen MW ± SEM; *Student's t-Test* bei normalverteilten Daten (**E, F, H**) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (**G**) (***) $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Die verringerte Dichte von Tbr2+ Zellen ließ auf eine verminderte Anzahl der als neuronale Vorläuferzellen fungierenden Intermediärgliazellen zum Tag E14,5 im Syndapin III KO im Vergleich zu WT schließen, mit entgegengesetztem Effekt zum Zeitpunkt E18,5. Darüber hinaus verzeichneten auch Sox2+ Vorläuferzellen eine Erhöhung der Zelldichte zum Zeitpunkt E18,5.

7.2.2.4 Analyse der neokortikalen laminaren Entwicklung mittels neuronaler Schichtenmarker

Zur präziseren Untersuchung der embryonalen Gehirnstruktur im Syndapin III KO wurde im Rahmen dieser Arbeit die Dichte der Neurone postnataler kortikaler Schichten im Vergleich der Genotypen zu den Zeitpunkten E14,5 und E18,5 untersucht. Für

die Analyse der Entwicklung der entstehenden Population von Neuronen zukünftiger kortikaler Schichten V und VI (Abb. 14A-F für repräsentative Färbungen beider Genotypen) haben die kortikalen schichtspezifischen Marker Ctip2 und FoxP2 Anwendung gefunden, welche Zellen markieren, die nicht von den Vorläuferzellmarkern Tbr2 und Sox2 detektiert werden. Ctip2+ Zellen haben keine Überschneidungen mit Tbr2+ und Sox2+ Zellen, da Ctip2 nicht in die Differenzierung der Vorläuferzellen involviert ist, sondern erst in post-mitotischen Pyramidenzellen, die aus dem Kortex herausprojizieren und sich am Ende der Embryonalentwicklung in Schicht V ansiedeln, exprimiert wird (Arlotta et al. 2005). FoxP2 besitzt eine putative Funktion in der neuronalen Migration bzw. Differenzierung während der späten Embryonalentwicklung ab dem Tag E18,5. Der Antikörper FoxP2 markiert keine Vorläuferzellen, sondern embryonale in tiefen Anteilen der Kortikalen Platte lokalisierte Zellen, da er Neurone markiert, die postnatal in Schicht VI angesiedelt sind (Ferland et al. 2003). Die für die migrierenden Neurone hoher Schichten verwendeten Antikörper Cux1 und Brn2 detektieren zusätzlich zu diesen Neuronen auch deren Vorläuferzellen (Nieto et al. 2004, Dominguez et al. 2013). Da Neurone hoher kortikaler Schichten später in der Embryonalentwicklung in der Subventrikularzone entstehen, gelten Intermediärgliazellen als Vorläuferzellen für Neurone dieser Schichten, sodass die markierten Vorläuferzellen größtenteils weiterhin auch Tbr2+ sind, während sie für Sox2 negativ sind (Lui et al. 2011).

Da zu den untersuchten embryonalen Zeitpunkten die Entwicklung der kortikalen Schichten noch nicht abgeschlossen ist, befanden sich die analysierten Neurone insbesondere zum Tag E14,5 noch nicht in ihrer finalen Lokalisation im Kortex, sondern wurden größtenteils während ihrer Migration markiert. Im Verlauf der Gehirnentwicklung durchwandern die embryonalen Neurone die Kortikale Wand von ihrem Ursprung (Ventrikularzone, Subventrikularzone), um an ihre endgültige Position (kortikale Schicht) zu gelangen. Dabei passieren sie die Intermediärzone, Subplatte und, bedingt durch die Generierung der Schichten von innen nach außen, die kortikalen tiefer lokalisierten Schichten (Rakic 1974, Molyneaux et al. 2007) (Abb. 1A).

Die Analyse der entstehenden Population von Projektionsneuronen zukünftiger tiefer kortikaler Schichten (Abb. 14A-F für repräsentative Färbungen beider Genotypen) ergab eine signifikante Erhöhung der Dichte Ctip2+ Projektionsneurone zum Zeitpunkt E14,5 um 24,8% (von $4,6 \pm 0,2$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $5,7 \pm 0,2$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO; $p < 0,001$) in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT (Abb. 14G).

Am Tag E18,5 konnte gegenläufig eine signifikante Abnahme um 24,0% (von $5,2 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $4,0 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO; $p < 0,001$) im Syn-dapin III KO verglichen mit WT detektiert werden (Abb. 14H). Der Antikörper FoxP2 wurde zur immunhistochemischen Analyse nur zum Zeitpunkt E18,5 verwendet, da FoxP2 am Tag E14,5 ausschließlich in lateralen Anteilen des Kortex exprimiert wird und in der Kortikalen Platte erst ab dem Tag E16,5 vorhanden ist (Ferland et al. 2003). Die Anwendung des Antikörpers FoxP2 zeigte zum Zeitpunkt E18,5 eine signifikante Reduzierung der Dichte FoxP2+ Neurone um 15,9% (von $2,4 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im WT auf $2,0 \pm 0,1$ Zellen/ $1000 \mu\text{m}^2$ im KO; $p = 0,023$) (Abb. 14I).

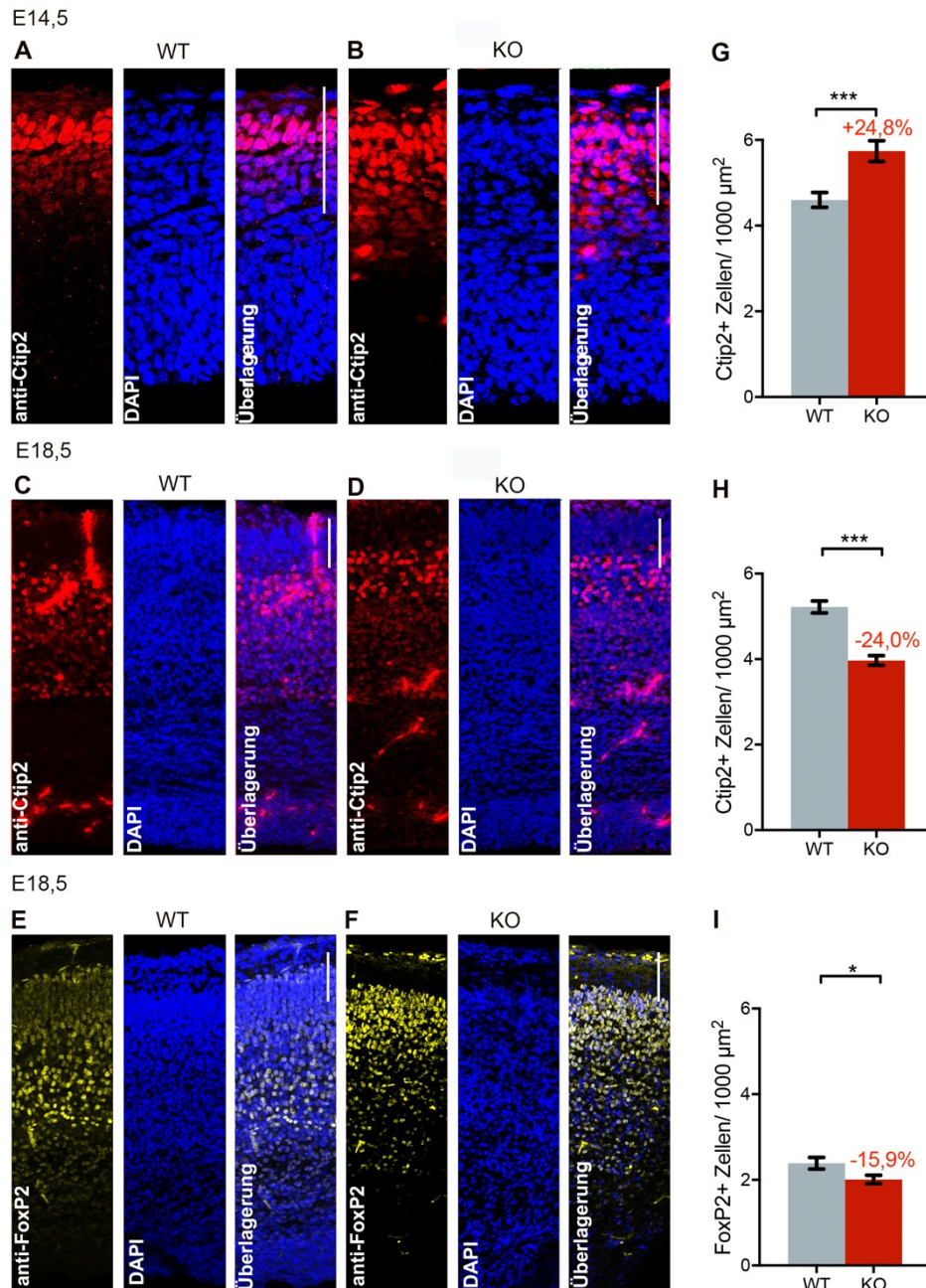


Abb. 14: Immunhistochemische Analyse Ctip2+ und FoxP2+ neokortikaler Neurone im embryonalen WT und Syndapin III KO. Dargestellt sind beispielhafte Färbungen embryonaler Kortexareale zum Zeitpunkt E14,5 (**A, B**) und E18,5 (**C-F**) im WT und Syndapin III KO mit den Schichtmarkern Ctip2 (rot) und FoxP2 (gelb, erst ab dem Zeitpunkt E18,5 exprimiert). Ferner sind DAPI+ Zellen (blau) sowie die Überlagerung der Färbungen zu sehen (**A-F**). Ergänzend ist die statistische Analyse der Dichte Ctip2+ Zellen zu den Zeitpunkten E14,5 (**G**) und E18,5 (**H**) sowie die statistische Auswertung der Dichte FoxP2+ Zellen zum Zeitpunkt E18,5 (**I**) dargestellt. Während die Dichte der Neurone postnataler tiefer Schichten zum Zeitpunkt E14,5 im Syndapin III KO im Vergleich zu WT erhöht war (**G**), konnte zum Tag E18,5 gegenläufig eine Reduzierung der Dichte der markierten Nervenzellen detektiert werden (**H, I**). Größenbalken: 100 μm. Stark angefärbte Bereiche mit abweichender Morphologie von den übrigen Zellen stellen Erythrozyten dar und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Daten zeigen MW ± SEM; *Student's t*-Test bei normalverteilten Daten (**I**) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (**G, H**) (* $p < 0,5$; *** $p < 0,001$); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Folglich wiesen Syndapin III KO Mäuse verglichen mit WT eine Zunahme der Dichte von markierten Neuronen tiefer kortikaler Schichten zum Zeitpunkt E14,5 auf. Bei E18,5 zeigte sich im Vergleich der Genotypen hingegen eine Verminderung der Dichte von Nervenzellen kortikaler Schichten V/VI im Syndapin III KO. Dies führte zu der Vermutung, dass es im Syndapin III KO während der Embryonalentwicklung zu einem transienten initialen Anstieg der Dichte der Neurone tiefer Schichten kommt, welcher zum Ende der Gehirnentwicklung am Tag E18,5 regredient ist.

Ausgehend von den identifizierten Effekten auf Vorläuferzellen und Neurone postnataler tiefer Schichten in Syndapin III KO Mäusen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur umfassenderen Analyse auch die Neurone der postnatalen hohen kortikalen Schichten untersucht. Dafür haben die Marker Cux1 (Schichten II-IV Marker) sowie Brn2 (Schicht II/III Marker, geringfügige Anfärbung von Schicht V Neuronen) Anwendung gefunden (Nieto et al. 2004, Dominguez et al. 2013, Hagino-Yamagishi et al. 1997). Analysen von Nieto et al. (2004) zeigten, dass das Detektionssignal von Cux1 in der Kortikalen Platte mit der zum Zeitpunkt E15,5 beginnenden Generierung von Neuronen hoher kortikalen Schichten II-IV korreliert (Abb. 1B). Die Anfärbung mit dem Marker Cux1 erbringt in der Kortikalen Platte zur Detektierung von Neuronen postnataler kortikaler Schichten II-IV somit erst ab dem Tag E16,5 valide Ergebnisse. Zum Zeitpunkt E14,5 werden von Cux1 hauptsächlich Vorläuferzellen in der Subventrikularzone markiert (Nieto et al. 2004), sodass insbesondere zu diesem Tag, aber auch zum Zeitpunkt E18,5, eine Überlappung der Färbung mit den Tbr2+ Intermediärgliazellen möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Färbung mit dem Antikörper Cux1 zum Zeitpunkt E18,5 im WT und Syndapin III KO durchgeführt (Abb. 15A, B) und resultierte in keiner signifikanten Veränderung der Dichte markierter Zellen (Abb. 15C).

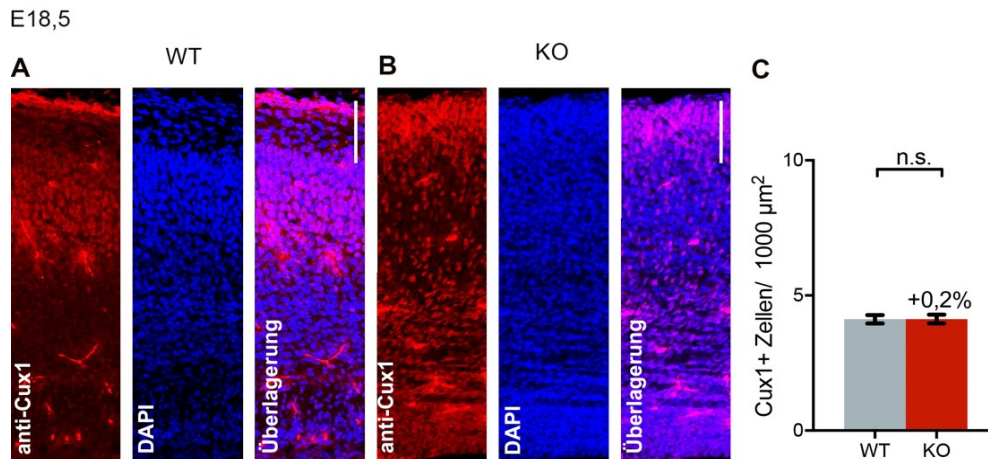


Abb. 15: Analyse immunfluoreszenter Cux1+ kortikaler Neurone im Vergleich der Genotypen. (A, B) Es sind beispielhafte Färbungen mit dem Schichtenmarker Cux1 (grün) zum Zeitpunkt E18,5 sowie DAPI+ Zellen (blau) und die Überlagerung der Färbungen im WT (A) und Syndapin III KO (B) zu sehen. Des Weiteren ist die statistische Auswertung der Cux1+ Zellen zum Tag E18,5 abgebildet (C). Die Analyse mit dem Antikörper Cux1 ergab ähnliche Ergebnisse im Vergleich der Genotypen ohne statistische Signifikanz. Größenbalken: 100 μm. Stark angefärbte Bereiche mit abweichender Morphologie von den übrigen Zellen stellen Erythrozyten dar und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Daten zeigen MW ± SEM; Daten waren normalverteilt, woraufhin anschließend ein *Student's t-Test* durchgeführt wurde (n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und *n*-Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Brn2 ist ein Marker für Projektionsneurone mit Verbindungen innerhalb des Kortex, die postnatal die Schicht II/III bilden. Zu einem geringen Anteil färbt Brn2 auch Neurone der Schicht V. Überdies markiert der Antikörper Brn2 ab dem Zeitpunkt E14,5 zu einem gewissen Anteil auch die Intermediärgliazellen, die sich in diese Neurone entwickeln, wodurch sich eine überschneidende Anfärbung der Marker Tbr2 und Brn2 ergibt (Dominguez et al. 2013) (Abb. 16A-D für repräsentative Färbungen im embryonalen WT und Syndapin III KO). Während der Embryonalentwicklung detektiert der Antikörper Brn2 insbesondere unreife Neurone, die ihre finale Zellteilung abgeschlossen und ihre Migration zu ihrer zukünftigen Kortexschicht begonnen haben, somit ist der Antikörper insbesondere nach der finalen Zellteilung exprimiert (Hagino-Yamagishi et al. 1997, Dominguez et al. 2013).

Die Untersuchung von Brn2+ Zellen ergab zum Zeitpunkt E14,5 eine signifikant um 16,5% (von $6,0 \pm 0,3$ Zellen/ 1000 μm² im WT auf $5,0 \pm 0,2$ Zellen/ 1000 μm² im KO; $p=0,002$) reduzierte Zelldichte im Syndapin III KO verglichen mit WT (Abb. 16E). Zum Tag E18,5 wurde gegenläufig eine signifikant erhöhte Dichte Brn2-angefärbter Neurone um 21,4% (von $3,5 \pm 0,2$ Zellen/ 1000 μm² im WT auf $4,2 \pm 0,2$ Zellen/ 1000 μm² im KO; $p<0,001$) bei Syndapin III Defizienz detektiert (Abb. 16F).

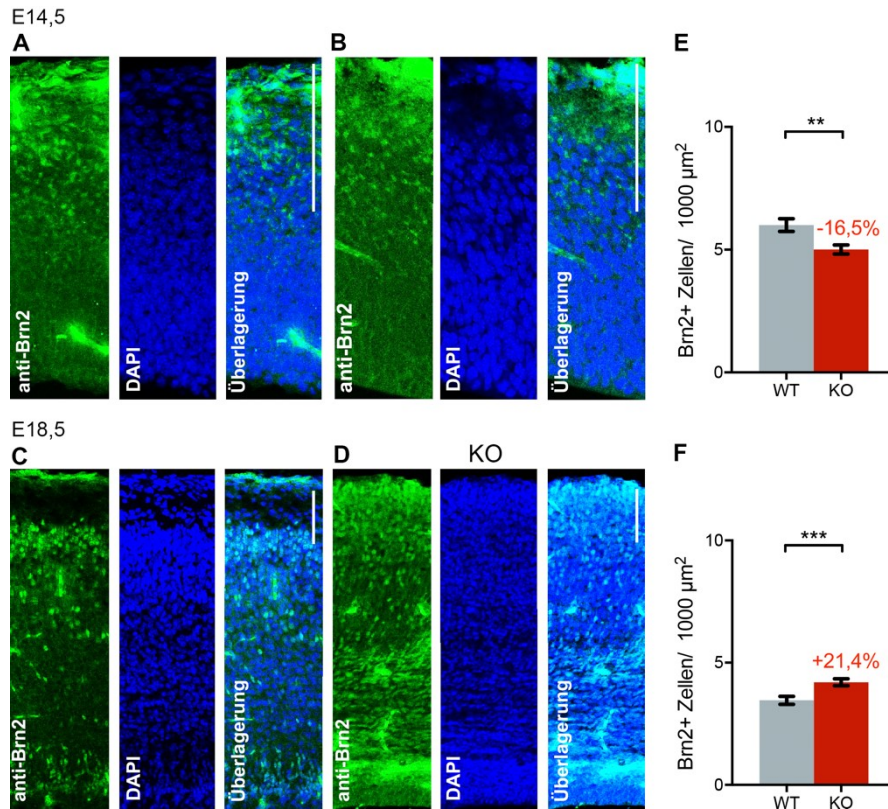


Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung Brn2+ Nervenzellen im embryonalen WT und Syndapin III KO. Abgebildet sind beispielhafte kortikale Färbungen des embryonalen WT (A, C) und Syndapin III KO (B, D) mit dem Antikörper gegen Brn2 (rot) zu den Zeitpunkten E14,5 (A, B) und E18,5 (C, D). Ergänzend sind DAPI+ Strukturen (blau) sowie die Überlagerung der Färbungen zu sehen. Des Weiteren ist die statistische Auswertung der Brn2+ Zellen zum Zeitpunkt E14,5 (E) und E18,5 (F) dargestellt. Die Analyse mit dem Marker Brn2 ergab eine verminderte Dichte der angefärbten Neurone im Syndapin III KO zum Tag E14,5 (E), sowie gegenläufig erhöhte Zelldichten bei Syndapin III Defizienz zum Zeitpunkt E18,5 (F) im Vergleich zu WT. Größenbalken: 100 µm. Stark angefärbte Bereiche mit abweichender Morphologie von den übrigen Zellen stellen Erythrozyten dar und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Daten zeigen MW ± SEM; *Student's t-Test* bei normalverteilten Daten (E) oder *Mann-Whitney-Test* bei nicht normalverteilten Daten (F) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und n -Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

Demzufolge konnten deutliche Abweichungen der Dichte Brn2+ Zellen bei Syndapin III Defizienz ermittelt werden, die sich zu den beiden Untersuchungszeitpunkten gegenläufig verhielten.

Eine detaillierte Gegenüberstellung der Summe aller Marker+ Zellen mit der mittels DAPI detektierten Gesamtzellendichte zu den Zeitpunkten E14,5 und E18,5 ist in Tabelle 4 angehängt.

Im Vergleich der angefärbten Zelldichte der einzelnen Marker mit der ermittelten DAPI+ Zelldichte ergibt sich für den Zeitpunkt E14,5, konsistent mit der Verwendung von Antikörpern gegen lediglich ein Teil der Zellen, eine geringere Summe Marker+ Zellen gegenüber der Gesamtzelldichte in beiden Genotypen. Zum Tag E18,5 zeigt die Auswertung der Summe der Dichte aller Marker+ Zellen höhere Werte als die jeweiligen Gesamtzelldichten in WT und Syndapin III KO Mäusen. Diese Beobachtung ist darin begründet, dass die zum Zeitpunkt E18,5 verwendeten Marker Ctip2 und FoxP2 sowie Cux1 und Brn2 sich teilweise miteinander sowie mit den Vorläuferzellmarkern Tbr2 und Sox2 überlappen, sodass einzelne Zellen von verschiedenen Antikörpern angefärbt und mehrmals in der Auswertung berücksichtigt wurden. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der Vorläuferzellen und der Nervenzellen des embryonalen Kortex von Syndapin III KO Mäusen eine abweichende Organisation des embryonalen Kortex und legen damit einen essenziellen Einfluss von Syndapin III auf die embryonale Kortexentwicklung nahe.

8 Diskussion

8.1 Syndapin III beeinflusst die komplexe Architektur des zerebralen Kortex und somit die synaptische Konnektivität

8.1.1 Die Syndapin III Defizienz führt zu Veränderungen der Dichte und Klassenverteilung dendritischer Dornfortsätze

Syndapin III ist ein Protein der Syndapin-Familie und wird ubiquitär und überall in Nervenzellen exprimiert (Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999, Modregger et al. 2000, Sumoy et al. 2001). Annähernd konforme Domänen-Strukturen der Syndapin-Isoformen (Abb. 4) sowie die kortikale Aufweitung des Dendritenbaumes (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ) ließen für Syndapin III eine ebenso kritische Rolle in der Ausbildung dendritischer Dornfortsätze vermuten, wie sie für Syndapin I bereits beschrieben worden ist (Schneider et al. 2014, Schael et al. 2013). Dementsprechend wurde die Übertragbarkeit der postsynaptischen Effekte von Syndapin I auf das Familienmitglied Syndapin III sowie dessen Einfluss auf die synaptische Konnektivität kortikaler Regionen im Rahmen dieser Arbeit untersucht und erstmalig eine Auswirkung der Syndapin III Defizienz auf dendritische Dornfortsätze des Kortex beschrieben. Die Analyse von Neuronen in murinen Gehirnschnitten aus den kortikalen Schichten II/III und V ergaben im Syndapin III KO verglichen mit WT verminderte Gesamtdornendichten mit deutlicher Reduzierung der reiferen Morphologiegruppen und besonderer Auswirkung auf stummelförmige Dornen (Schicht II/III: stummelförmige Dornen - 70,2%; dünne Dornen -31,9%; pilzförmige Dornen -35,8%; Schicht V: stummelförmige Dornen -58,3%; dünne Dornen -24,5%; pilzförmige Dornen: -31,8%). Auch die filopodienähnlichen Dornen zeigten Tendenzen zu einer deutlichen Verminderung der Dornendichte im Syndapin III KO verglichen mit WT (Schicht II/III: -20,7%; Schicht V: -8,7%) ohne statistische Signifikanz. Im Zusammenhang mit der zuvor detektierten Verlängerung und Volumenzunahme des Dendritenbaumes (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ) hätte eine unveränderte Dornfortsatzdichte auf eine erhöhte Gesamtinputbilanz der Pyramidenzellen mit resultierender gesteigerter Aktivierung kortikaler Netzwerke hingedeutet. Die verringerte Dichte dendritischer Dornfortsätze im Syndapin III KO ließ entgegengesetzt eine kompensatorische Gegenregulation des neuronalen Systems vermuten, durch welche sich die Veränderungen des Dendritenbaumes zumindest partiell ausgleichen könnten, um somit Störungen in der synaptischen Transmission

zu vermeiden bzw. zu begrenzen. Diese Beobachtungen belegten Veränderungen in synaptischen Verbindungen und der Architektur des zerebralen Kortex bei Syndapin III Defizienz. Die verringerte Dornendichte ließ eine kritische Funktion von Syndapin III für Prozesse, welche die Ausbildung bzw. Erhaltung der Dornfortsätze regulieren, annehmen. Die Reduzierung der Dichte reiferer Dornen im Kortex von Syndapin III KO Mäusen war konsistent mit morphologischen Analysen im Hippocampus von Syndapin I KO Mäusen, welche eine Verminderung der Gesamtdornendichte um 8,7% im Vergleich zu WT zeigten (Schneider et al. 2014). Dadurch konnten ähnliche Funktionen der Syndapin-Isoformen in neuronalen Prozessen dendritischer Dornen geschlussfolgert werden. Die genauere Analyse kortikaler postsynaptischer Daten im Vergleich der beiden *knockouts* ergaben, dass im Syndapin III KO gravierende Effekte existieren. Bei Syndapin III Defizienz zeigte die Gesamtdornendichte eine Reduzierung um 36,1% in der kortikalen Schicht II/III und um 40,9% in der kortikalen Schicht V. Im Syndapin I KO hingegen wurde in der kortikalen Schicht II/III eine um 10,0% erhöhte und in der kortikalen Schicht V eine um 2,4% reduzierte Dornendichte im Vergleich zum WT detektiert (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Elisa Engelmann, Institut für Biochemie I, UKJ) (Abb. 17).

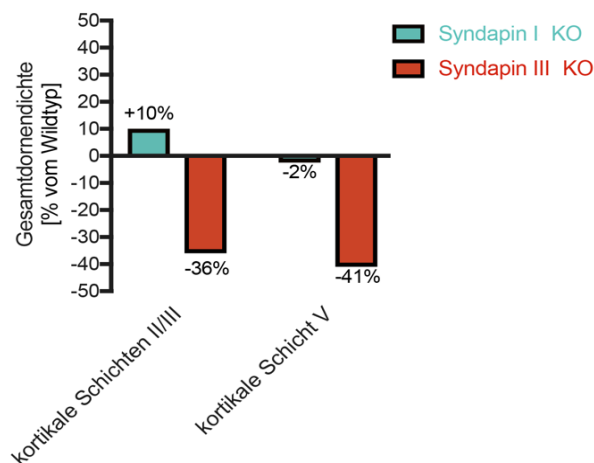


Abb. 17: Vergleich der Dichte kortikaler dendritischer Dornen von Syndapin I und Syndapin III KO Mäusen. Dargestellt ist die kortikale prozentuale Verringerung der dendritischen Dornfortsatzdichte des jeweiligen KO in Relation zum WT. Bei Syndapin III Defizienz konnte verglichen mit Syndapin I KO Mäusen eine deutlichere Reduzierung der Dornendichte ermittelt werden. Daten wurden auf ganze Zahlen gerundet.

Die Phänotypen der Syndapin I und Syndapin III KO Mäuse zeigten deutliche Unterschiede. Während Syndapin I-defiziente Mäuse repetitive generalisierte, klonische Krampfanfälle sowie eine erhöhte hippocampale Netzwerkaktivität zeigten (Koch et al. 2011), wiesen Syndapin III KO Mäuse keine epileptischen Symptome, jedoch einen Phänotyp der Skelettmuskulatur und im Sozialverhalten sowie Nestbau auf (Seemann et al. 2017).

Während der Kortexreifung kommt es zu zeitlich regulierten Umwandlungen bzw. Klassenänderungen dendritischer Dornen (Dailey und Smith 1996). Filopodienähnliche Dornenvorstufen verschwinden und werden sukzessive durch reifere Dornenklassen ersetzt, sodass die meisten Dornen im adulten Kortex zur Gruppe der pilzförmigen Dornen gehören (Harris et al. 1992). In Konsistenz mit dieser Hypothese stehen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen, die jedoch im adulten Syndapin III KO verglichen mit WT eine Verminderung reiferer Morphologiegruppen anzeigen (Abb. 8). Die durchgeführten Untersuchungen der Dornenverteilung der Subklassen dendritischer Dornen detektierten im Syndapin III KO verglichen mit WT insbesondere eine deutliche Reduzierung der Dichte der stummelförmigen Dornen pro 10 µm Dendrit (Schicht II/III: -2,6 Dornen; Schicht V: -2,1 Dornen). Die zweitgrößte Verringerung der Dichte pro 10 µm Dendrit im Syndapin III KO im Vergleich zu WT zeigten pilzförmige Dornen (Schicht II/III: -2,3 Dornen; Schicht V: -1,7 Dornen), welche die reifste Morphologiegruppe darstellen, vermeintlich die effizienteste synaptische Transmission gewährleisten und normalerweise zahlreich im adulten Kortex vertreten sind (Kasai et al. 2003, Matsuzaki et al. 2004, Parajuli et al. 2017). Die unreifen filopodienähnlichen Dornen ließen demgegenüber statistisch nicht signifikante Tendenzen zu einer geringen Regression der Dichte pro 10 µm Dendrit im Syndapin III KO im Vergleich zu WT verzeichnen. Begründet durch die deutliche Abnahme der Gesamtdornendichte zeigten dünne, pilzförmige und filopodienähnliche Dornen bezüglich der relativen Häufigkeit prozentual eine Zunahme bei Syndapin III Defizienz, hinsichtlich welcher die filopodienähnlichen Dornen den weitaus stärksten Anstieg verzeichneten (Schicht II/III: 28,0%; Schicht V: 41,7%). Die resultierende Überrepräsentation unreifer Dornen im Syndapin III KO verglichen mit WT konsolidierte die Vermutung eines Einflusses von Syndapin III auf dendritische Dornfortsätze und deutete auf eine Involvierung des Proteins in Reifungsprozesse der Dornen hin. Fraglich ist, ob die Reduktion reifer Dornen durch eine gestörte Umwandlung von filopodienähnlichen Vorklassen zu reiferen Morphologiegruppen oder durch eine fehlerhafte Aufrechterhaltung ausgebildeter stabiler Dornen verursacht worden ist. Des Weiteren könnte ein beschleunigtes *Pruning* ursächlich für die beobachteten Effekte sein. *Pruning* ist eine Form der Synapseneliminierung, welche synaptische Verknüpfungen moduliert, indem redundante oder nicht mehr funktionsfähige Verbindungen abgebaut werden (Kantor und Kolodkin 2003). Zukünftige, weiterführende Analysen der dendritischen Dornfortsätze mit Untersuchung der Dornen-

dichte und morphologischen Klassenverteilung zu verschiedenen Alterszeitpunkten sowie Untersuchungen am lebenden Präparat, beispielsweise in Schnittkulturen, wären geeignet, um einen präziseren Einblick in den Ablauf der Reifungsprozesse dendritischer Dornfortsätze bei Syndapin III Defizienz zu erhalten und potenzielle Entwicklungsstörungen zu untersuchen.

8.1.2 Syndapin III KO Mäuse besitzen im Vergleich zu WT eine unreifere Dornengestalt

Da im adulten Gehirn Prozesse zur morphologischen Reorganisation der Dornfortsätze überwiegen und Veränderungen der Dornenanzahl nur noch nachrangig stattfinden (Grutzendler et al. 2002), wurden neben der Dornenquantität Abweichungen in der Dornengestalt analysiert. In Konsistenz mit den Untersuchungen der Dornendichte schien sich die Syndapin III Defizienz insbesondere auf die Ausbildung der Morphologie stabiler reifer Dornenköpfe auszuwirken. In den Analysen der vorliegenden Arbeit konnte im Syndapin III KO eine geringere Kopfweite sowie ein deutlich geringeres Kopfvolumen von pilzförmigen Dornen in der kortikalen Schicht II/III im Vergleich zu WT ermittelt werden (Kopfweite: Schicht II/III: -4,7%; Schicht V: -2,2%; Kopfvolumen: Schicht II/III: -21,3%; Tendenz in Schicht V ohne statistische Signifikanz: -6,1%). Auch die reiferen dünnen Dornen zeigten in der Schicht II/III signifikante Abnahmen in Kopfweite (-3,9%) und Kopfvolumen (-31,8%) im Syndapin III KO verglichen mit WT. Ergänzend zu den Veränderungen des Dornenkopfes ergaben die Ausmessungen der Dornenlängen im Syndapin III KO verglichen mit WT in allen Morphologiegruppen (stummelförmig, dünn, pilzförmig, filopodienähnlich) der Schicht II/III eine Zunahme und ließ somit auf eine ubiquitäre Elongation dendritischer Dornfortsätze in dieser Kortexschicht schließen. In Schicht V zeigten sich signifikante Verlängerungen der pilzförmigen und filopodienähnlichen Dornen im Syndapin III KO verglichen mit WT, während dünne Dornen überdies ähnliche Tendenzen verzeichneten. Summarisch zeigten die Dornenlängen der ausgewerteten dendritischen Dornfortsätze in den Kortexschichten II/III sowie V im Syndapin III KO signifikante Zunahmen im Vergleich zu WT (Schicht II/III: 22,7%; Schicht V: 18,5%) (Abb. 10). Die in der Arbeit durchgeführten Analysen enthüllten eine gestörte Ausprägung der Dornengestalt bei Syndapin III Defizienz und konsolidierten somit die aus der Untersuchung der Dornenquantität und Morphologieklassenverteilung resultierende Vermutung, dass Syndapin III in Dornenreifungs- sowie

Dornenremodulierungsprozesse involviert ist. Die beobachteten morphologischen Effekte könnten eine Verschiebung der Anteile zwischen den Morphologiegruppen beeinflussen. Eine mögliche Erklärung für die ausgeprägte Reduzierung der Dichte stummelförmiger Dornen lieferte die programmierte Klassenzuteilung des verwendeten MATLAB-Klassifizierungsmodul der *Imaris-Software* (Tabelle 3). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die stummelförmigen Dornen im Syndapin III KO aufgrund der Elongation zu einem gewissen Anteil den pilzförmigen Dornen zugeteilt wurden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Verminderung der Kopfweite pilzförmiger Dornen eine Zuordnung zu der dünnen Subklasse im Syndapin III KO nach sich zog. Folglich konnte die exakte Veränderung der Anteile und Dichte der einzelnen reiferen Morphologiegruppen nicht final geklärt werden. Wahrscheinlich erscheint, dass die Dichte pilzförmiger Dornen noch deutlicher reduziert anzunehmen ist, als in den Analysen dieser Arbeit beschrieben wurde.

Die Dornfortsatzkopfgröße ist proportional zur Größe der PSD und korreliert mit der Anzahl postsynaptischer Glutamat-Rezeptoren und Calcium-Ionen sowie präsynaptisch angedockter Vesikel, variiert somit die Quantität der Neurotransmitter und demzufolge die Stärke der synaptischen Transmission (Harris und Stevens 1989, Nusser et al. 1998, Schikorski und Stevens 1999). Da Struktur und Funktion von Postsynapsen sich gegenseitig stark beeinflussen, ließen die deutlichen strukturellen Veränderungen im Syndapin III KO als Konsequenz funktionelle Auswirkungen vermuten und die detektierten kleineren Köpfe im Syndapin III KO ein schwaches und langsamer zur Postsynapse weitergeleitetes präsynaptisches Signal annehmen. Vorausgehende Studien zeigten bereits eine lineare Korrelation von Dornenkopfvolumina und synaptischer Ströme (Schikorski und Stevens 1999). Die Funktion des Halses dendritischer Dornen ist darin begründet, dass er elektrische Spannungen filtert (Araya et al. 2006). Somit ist durch die Verlängerung der Dornenhälsa im Syndapin III KO, ebenso wie durch die Verkleinerung der Dornenköpfe, eine Verminderung der exzitatorischen Erregungen der Pyramidenzellen zu erwarten. Insofern standen die Veränderungen der Dornenmorphologie bei Syndapin III Defizienz im Einklang mit der verminderten Dornendichte sowie der Überrepräsentation unreifer Dornenklassen im Syndapin III KO verglichen mit WT. Da sich im ZNS Erregung und Hemmung von Neuronen ergänzen, um eine ausgeglichene Aktivität neuronaler Netzwerke zu gewährleisten, beeinflussen dendritische Dornfortsätze als Träger des Großteils exzitatorischer postsynaptischer Endigungen die synaptische Transmission. Elektrophysiologische

Untersuchungen mittels *Patch-Clamp*-Messungen an Syndapin I deletierten hippocampalen Rattenneuronen ließen verringerte Frequenzen der exzitatorischen, postsynaptischen Miniaturströme bei unveränderten Amplituden detektieren und wiesen somit auf eine Reduzierung funktioneller Synapsen hin, welche aus der gestörten Bildung und Aufrechterhaltung reifer Dornen bei Syndapin I Defizienz zu resultieren schienen (Schneider et al. 2014). Die Analysen von Schneider et al. (2014) wurden an Syndapin I deletierten Neuronen durchgeführt, die präsynaptischen Input von untransfizierten Zellen erhielten. Somit konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte auf postsynaptische Prozesse zurückzuführen waren. Da die Analysen der vorliegenden Arbeit von Syndapin III-defizienten Mäusen morphologische und quantitative Veränderungen dendritischer Dornen aufdeckte, die in vorhergehenden Studien mit einer schwächeren synaptischen Erregung in Zusammenhang gebracht wurden, erschienen Abweichungen in der synaptischen Transmission im Syndapin III KO verglichen mit WT wahrscheinlich. Zur Hinterfragung dieser Vermutung könnten elektrophysiologische Analysen bei Syndapin III Defizienz Gegenstand künftiger Untersuchungen sein, um zu verifizieren, ob die gestörte Dornenmorphologie in einer veränderten synaptischen Übertragung und somit in funktionellen Auswirkungen resultiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierten strukturellen neuronalen Auswirkungen der Syndapin III Defizienz können den detektierten adulten Phänotyp im Sozialverhalten und Nestbau putativ begründen und bilden die Basis für zukünftige, weiterführende funktionelle Analysen.

8.1.3 Die pathophysiologische Relevanz von Syndapin III im Kortex

Eine Vielzahl psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen, deren Beispiele von mentaler Retardierung über ASD, Demenz, Schizophrenie bis hin zu Epilepsie reichen, gehen mit strukturellen und funktionellen Abweichungen in synaptischen Verbindungen des Gehirns einher (Forrest et al. 2018). Bei diesen Veränderungen handelt es sich u.a. um Abweichungen in der Dichte und Morphologie dendritischer Dornen sowie um den Verlust von Synapsen und daraus resultierende Störungen in synaptischer Transmission sowie Plastizität (Blanpied und Ehlers 2004, Penzes et al. 2011). In kortikalen Pyramidenzellen beginnt die Dornenentwicklung in der Mitte der ersten postnatalen Woche. Die Dornendichte steigt kontinuierlich in den darauffolgenden vier Wochen an und ist mit zunehmendem Alter wieder rückläufig (Ziv und Smith 1996, Dunaevsky et al. 1999, Hua und Smith 2004). Nach initialer Überproduk-

Ergebnissen an Schizophrenie erkrankter Patienten, ließen für die verringerte Dornenzahl entweder gestörte Erhaltungsprozesse der stabilen Dornen oder ein abweichendes initiales Wachstum bzw. eine veränderte Formierung der Dornen aufgrund fehlerhafter Reifungsprozesse vermuten. Adulte Syndapin III KO Mäuse waren zwar nicht an Schizophrenie erkrankt, wiesen allerdings in Verhaltensversuchen Abweichungen in der Sozialen Interaktion auf (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Eine Involvierung von Syndapin III in distinkte pathophysiologische Prozesse der Schizophrenie erscheint möglich. Bei Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie konnten mittels proteomischer 2D-Gelelektrophorese veränderte Proteinmuster in der grauen Substanz gezeigt werden (Pennington et al. 2008). Pennington et al. (2008) wiesen u.a. veränderte Expressionslevel mehrerer synaptischer Proteine, einschließlich einer verminderten Expression des neuronalen Syndapin I, nach. Viele der detektierten Proteine mit verändertem Expressionslevel besaßen überdies eine Rolle in Funktionen von NMDA-Rezeptoren (Pennington et al. 2008). Abweichungen in der Funktion von Glutamatrezeptoren in der Pathophysiologie von Schizophrenie wurden bereits beschrieben (Goff und Coyle 2001) und erscheinen auch im Syndapin III KO durch die detektierten Störungen insbesondere reifer Dornen möglich. Zusätzlich zur verminderten Expression von Syndapin I wurde eine Vielzahl von Proteinen bei schizophrenen Patienten als verändert identifiziert, die direkte Bindungspartner von Syndapin darstellen, wie z.B. Dynamin und Synaptojanin (Pennington et al. 2008).

Analysen von Kim et al. (2015) in Aktin-ähnlichen Protein 3 Homolog C (ARP3C) KO Mäusen zeigten, dass eine Störung der Aktindynamik in kortikalen Bereichen in einer abweichenden Morphologie dendritischer Dornen sowie in einem psychotischen hyperaktiven Phänotypen von KO Mäusen resultierte (Kim et al. 2015). Es liegt nahe, dass die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Effekte von Syndapin III auf dendritische Dornen zu einem gewissen Teil durch gestörte Prozesse des Aktinzytoskeletts bedingt sind. Die Umstrukturierungen des dendritischen Aktinzytoskeletts sind grundlegend für Induktion, Reifung und morphologische Reorganisation von postsynaptischen dendritischen Dornfortsätzen (Harris und Kater 1994, Dunaevsky et al. 1999, Matus 2000, Schubert et al. 2006, Tada und Sheng 2006). Der Verlust Aktin-bindender sowie -vernetzender Proteine resultiert in gestörten Bildungs- und Reifungsprozessen dendritischer Dornen (Hering und Sheng 2003, Okamoto et al. 2007). Syndapin III assoziiert über seine SH3-Domäne mit Interakti-

onspartnern wie Dynamin, N-WASP und Synaptojanin (Modregger et al. 2000, Ahuja et al. 2007, Schneider et al. 2014). Durch die F-BAR-Domänen-vermittelte Fähigkeit zur Selbstassoziation können überdies mehrere SH3-Domänen-Bindungspartner sowie das Aktinzytoskeletts mit Membranmodulationsvorgängen räumlich miteinander verknüpft werden (Kessels und Qualmann 2006, Qualmann et al. 1999). Eine wesentliche Rolle für die Syndapin I Defizienz-vermittelten Defekte in der Postsynapsenbildung und -funktion wurde kürzlich für die SH3-vermittelte Bindung von Syndapin I an das PSD-Gerüstprotein ProSAP1 belegt und der Verlust exzitatorischer Synapsen durch eine gestörte ProSAP1 Organisation als mögliche Erklärung diskutiert (Schneider et al. 2014, Koch et al. 2011). Störungen in der Ausbildung neuronaler Netzwerke durch ProSAP1 wurden bereits mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wie ASD assoziiert (Grant 2012). Da auch Syndapin III die C-terminale SH3-Domäne besitzt, welche die ProSAP1 Bindung vermittelt und *in-vitro*-Bindungsrekonstruktionen die Interaktion beider Proteine bestätigen (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Dr. Rashmi Ahuja Toivanen, Institut für Biochemie I, UKJ), scheint eine Beteiligung von Syndapin III an der Rekrutierung von ProSAP1 zur korrekten Lokalisation im Dornenkopf und darüber hinaus ein Einfluss von Syndapin III auf die Postsynapse wahrscheinlich. Proteine der ProSAP-Familie nehmen als Gerüstproteine der PSD eine wichtige Rolle in der Organisation von Neurotransmitterrezeptorkomplexen und in der Verknüpfung der PSD mit dem Aktinzytoskelett des Dornfortsatzkopfes ein (Grabrucker et al. 2011). Unter ProSAP1 Deletion konnte in dendritischen Dornfortsätzen ein markanter Volumenverlust sowie eine unreifere Dornenmorphologie detektiert werden (Berkel et al. 2012). Diese Effekte standen im Einklang mit detektierten Auswirkungen bei Syndapin III Defizienz und bekräftigten eine kritische Rolle der Syndapin III/ProSAP-Interaktion für Bildungs- und Reifungsprozesse in dendritischen Dornfortsätzen. Überdies trugen Analysen von weiteren ProSAP-assoziierten Proteinen, wie z.B. Aktin-bindendes Protein 1 (Abp1), zum Verständnis der Regulation des Zytoskeletts dendritischer Dornen während Reifungs- und Remodulierungsprozessen bei. Abp1 ist ein postsynaptisch angereichertes Protein, welches an filamentöse Aktinfilamente bindet und die Arp2/3-Komplex-medierte Aktinnukleation über N-WASP kontrolliert (Kessels et al. 2000, Pinyol et al. 2007). Auch Syndapine können mittels N-WASP/Arp2/3-Komplex-vermittelter Aktinfilamentneubildung die Topologie der Plasmamembran modulieren (Qualmann et al. 1999, Dharmalingam et al. 2009). In Abp1-defizienten Neuronenkulturen zeigte sich zusätz-

lich zu einer signifikanten Reduzierung der Dichte pilzförmiger Dornen eine verminderte Synapsendichte (Haeckel et al. 2008). Als Ursache für diese Effekte wurde die Abp1-vermittelte Kontrolle des Arp2/3-Komplex aktivierenden und somit Aktinpolymerisation regulierenden Proteins N-WASP beschrieben (Haeckel et al. 2008). Der Arp2/3-Komplex ist in dendritischen Dornen lokalisiert (Rácz und Weinberg 2008). Seine wesentliche Rolle in der Aktinnukleation wurde bereits belegt, was eine essenzielle Beteiligung in der Formierung dendritischer Dornen und Synapsen sowie Ausprägung der Dornenköpfe impliziert (Wegner et al. 2008, Hotulainen et al. 2009).

Syndapine sind in der Lage, in Membranen zu inserieren und positive Krümmungen zu induzieren (Kessels und Qualmann 2006, Frost et al. 2008, Itoh et al. 2005, Dharmalingam et al. 2009). Membran-gebundenes Syndapin I ist in Dornfortsätzen v.a. im Kopfbereich sowie an der Basis in Komplexen angereichert (Schneider et al. 2014). Die Umgestaltung des kortikalen, verzweigten Aktinzytoskeletts an distinkten Membranarealen gewährleistet die Ausstülpung filopodienähnlicher Strukturen sowie die Erzeugung der Dornfortsatzkrümmung, welche auch für Morphologieveränderungen des Dornfortsatzkopfes benötigt werden (Dunaevsky et al. 1999, Fischer et al. 1998). Analysen von Carlson et al. (2011) zeigten, dass das an negativ gekrümmte Membranen bindende F-BAR-Domänenprotein *WASP Verprolin-homologous protein-associated Rac GTPase-activating protein* (WRP) filopodienähnliche Dornfortsatzvorstufen initiiert sowie negative Krümmungen induziert (Carlson et al. 2011) und somit ebenso wie das F-BAR-Domänenprotein Formin-bindendes Protein 17 (FBP17) (Wakita et al. 2011) Funktionen in der Bildung und Aufrechterhaltung von Dornfortsätzen besitzt. Eine Koppelung der Aktinnukleationsprozesse des Arp2/3-Komplexes über N-WASP-Interaktion mit sich ausbildenden ProSAP-Plattformen an diesen Syndapin I-Komplexen in Kopf- sowie Basis-Regionen während der Dornfortsatzbildung wurde bereits in vorherigen Studien vorgeschlagen (Schneider et al. 2014) und liegt folglich auch für Syndapin III nahe. Somit könnte Syndapin III durch seine Rolle in der Aktindynamik, ebenso wie Syndapin I, während der Dornfortsatzbildung den Funktionen von anderen Aktinzytoskelett-regulierenden und mit ProSAP-interagierenden Proteinen, wie beispielsweise Abp1, zeitlich vorgeschaltet sein und somit die detektierten verlängerten Dornen bei Syndapin III Defizienz im Vergleich zum WT mit bedingen. Da Syndapin III putativ an der Aktinpolymerisation und somit an der Ausbildung verzweigter Aktinfilamente mittels seiner N-WASP Interaktion be-

teiligt ist, scheint eine Involvierung in Kontrollprozesse der Dornenlänge wahrscheinlich. Möglicherweise resultierte der Verlust von Syndapin III in einer gestörten Bildung verzweigter Aktinfilamente und somit fehlerhaften Regulierung von Dendritenausstülpungen. Im Einklang mit dieser Annahme standen die Ergebnisse von Studien am Zebrafischmodell, in denen bei Syndapin I Defizienz verlängerte aktinreiche Zilien ermittelt wurden (Schüler et al. 2013). Zusammengenommen schien Syndapin III vermutlich, u.a. über die Regulation der Aktindynamik, eine kritische postsynaptische Funktion für die Bildung, Stabilität und Reorganisation v.a. reiferer Dornfortsätze zu besitzen. Die präzisere Erforschung von Signalwegen, Genen und Proteinen, die Wachstum und Erhaltung von Dendriten sowie die Organisation des kortikalen Netzwerks beeinflussen, könnte zu einem besseren Verständnis pathophysiologischer Prozesse in neuropsychiatrischen Erkrankungen beitragen sowie weitere Ansätze für die Optimierung der Diagnostik oder therapeutischen Interventionen liefern.

8.2 Der Einfluss von Syndapin III auf die embryonale Entwicklung des Kortex

8.2.1 Die Auswirkungen der Syndapin III Defizienz auf die Organisation des Kortex und auf embryonale Vorläuferzellen

Im adulten Syndapin III KO konnten im Vergleich zu WT postsynaptische Veränderungen dendritischer Dornfortsätze detektiert werden. Überdies erschienen jedoch weitere Einflüsse von Syndapin III auf neuronale Prozesse zu existieren, die den beschriebenen veränderten Phänotyp der adulten Syndapin III KO Mäuse im Sozialverhalten und Nestbau potenziell begründen könnten. Bisher existierten keine *in-vivo* Daten über embryonale neuronale Funktionen der Syndapine. Da Syndapin III bereits zu frühen embryonalen Zeitpunkten im murinen ZNS exprimiert wird (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ) und transiente Veränderungen während der Gehirnentwicklung Langzeitauswirkungen bedingen können, die später in Verhaltensstörungen resultieren (Normand et al. 2013), wurde im Rahmen dieser Arbeit, als weiterer Ansatzpunkt für den adulten Verhaltensphänotypen der Syndapin III KO Mäuse, die embryonale Entwicklung des zerebralen Kortex untersucht.

Es existieren spezifische Entwicklungszeitfenster, in denen bestimmte Gehirngebiete besonders sensitiv für Veränderungen sind und somit eine erhöhte Vulnerabilität besitzen. Untersuchungen zeigten, dass der embryonale Tag E14,5 einen kritischen

Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung darstellt (Takahashi et al. 1993, Belinson et al. 2016). Insbesondere an diesem Tag findet eine präzise Generierung von Vorläuferzellen und Neuronen des Kortex statt (Caviness und Takahashi 1995). Eine Expansion der Kortalen Platte zu diesem Zeitpunkt wurde bereits mit einer gestörten Proliferation bzw. Differenzierung von kortalen Vorläuferzellen assoziiert (Belinson et al. 2016). Das frühe embryonale Wachstum der Vorläuferzellen initiiert eine Ausweitung des Kortex in radiale Dimensionen, bevor im fortschreitenden Verlauf der Entwicklung Differenzierungsprozesse der Vorläuferzellen überwiegen, die das Wachstum des Kortex in radiale und laterale Dimensionen initiieren (Florio und Huttner 2014) (Abb. 19 zur Visualisierung der beiden Dimensionen des Kortex).

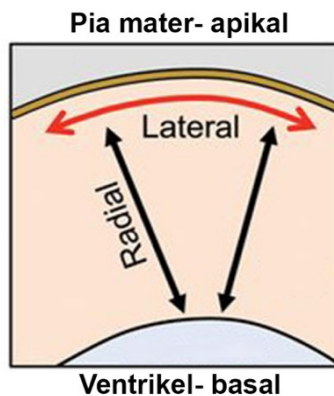


Abb. 19: Die Dimensionen des sich entwickelnden Neokortex. Dargestellt sind die beiden hauptsächlich Dimensionen, in die sich der Neokortex entwickeln kann. Möglich ist eine Expansion in laterale (orangener Pfeil) und radiale Dimensionen (schwarzer Pfeil). Die radiale Achse des Neokortex korrespondiert mit der apikal-basalen Achse der Vorläuferzellen. Modifiziert nach Florio und Huttner (2014).

Im Syndapin III KO verglichen mit WT zeigte die Analyse der relativen Ausdehnung der Kortalen Platte, bezogen auf die Kortalen Wand, zum Zeitpunkt E14,5 eine Zunahme um ungefähr 15%, was konsistent mit den Untersuchungen von Belinson et al. (2016) einen Einfluss auf die Reifungsprozesse neuronaler Vorläuferzellen vermuten ließ. Insbesondere könnte eine veränderte Expansion der Kortalen Platte durch eine putative fehlerhafte Proliferierung von Tbr2+ Vorläuferzellen bedingt sein, da Tbr2+ Zellen das radiale Wachstum der Kortalen Platte initiieren (Lui et al. 2011). Immunfluoreszente Analysen dieser Arbeit verzeichneten in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT eine signifikante Reduzierung der Dichte Tbr2+ Zellen um ungefähr 15% zum Zeitpunkt E14,5. Der Transkriptionsfaktor Tbr2 wird von Intermediärgliazellen exprimiert (Hevner et al. 2006, Vasistha et al. 2015). Insbesondere die Intermediärgliazellen besitzen eine wesentliche Funktion für die Regulierung der Anzahl zukünftiger glutamaterger Neurone (Florio und Huttner 2014), sodass die detektierte Verminderung der Zelldichte Tbr2+ Zellen im Syndapin III KO verglichen mit WT eine Reduzierung der Intermediärgliazellen zum Tag E14,5 anzeigte und folglich

eine Veränderung von exzitatorischen Neuronen des Kortex im Syndapin III KO vermuten ließ (Sessa et al. 2017). Im Zusammenhang damit standen die durchgeführten Analysen unter Anwendung der Ctip2-Färbung, welche eine deutliche Zunahme der Dichte der Projektionsneurone zukünftiger tiefer kortikaler Schichten um nahezu 25% in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT zum Zeitpunkt E14,5 verzeichneten. Die Nervenzellen tiefer kortikaler Schichten entstehen zeitlich zuerst im embryonalen Neokortex (Molyneaux et al. 2007). Ihre Vorläuferzellen entwickeln sich üblicherweise zwischen den Tagen E11,5 und E14,5 (Molyneaux et al. 2007). Da die postmitotischen Neurone nach ihrer Differenzierung zur Kortikalen Platte migrieren und ein Großteil der Neurone der tiefen Schichten zum Tag E14,5 diese Migration bereits vollzogen hat (Abb. 1A), könnte die relative Expansion der Kortikalen Platte im Syndapin III KO verglichen mit WT durch die Erhöhung der Dichte Ctip2+ Nervenzellen tiefer Schichten begründet sein. Der Antikörper Ctip2 färbt vorwiegend kortikale Projektionsneurone (Arlotta et al. 2005). Eine Zunahme der Ctip2+ Zellen im embryonalen Neokortex könnte durch drei Fehlregulierungen der Vorläuferzellentwicklung bedingt sein: 1. eine erhöhte Anzahl der initialen Vorläuferzellen (Radialgliazellen), 2. eine gesteigerte Teilung der Vorläuferzellen in Neuronen-generierende Nachfolger (Intermediärgliazellen) sowie 3. eine überzählige Teilung der Intermediärgliazellen in Neurone (Lui et al. 2011). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Nervenzelldichte bei verminderter Vorläuferzellzahl im Syndapin III KO zum Zeitpunkt E14,5 könnte sein, dass sich zu früheren embryonalen Zeitpunkten, vor dem Tag E14,5, bereits Vorläuferzellen übermäßig in die zur Kortikalen Platte migrierenden Neurone zukünftiger tiefer Schichten differenziert haben. Es stellte sich jedoch die Frage, wodurch diese initial erhöhte Differenzierung der Vorläuferzellen im Syndapin III KO bedingt sein könnte. Möglich erscheinen Störungen in der Regulierung der Kortikogenese unter Syndapin III Defizienz. Während der Entwicklung des Neokortex durchlaufen neuronale Vorläuferzellen verschiedene zeitlich und räumlich koordinierte Phasen: Proliferation, Differenzierung in Neurone, Migration zu ihrer finalen Position sowie Verknüpfung mit anderen Zellen zu Netzwerken (Marín-Padilla 1992, Heng et al. 2010). Für alle diese Prozesse ist die dynamische Modulation des zellulären Aktinzytoskeletts unabdingbar (Dehay und Kennedy 2007, Molyneaux et al. 2007, Rakic 2009, Heng et al. 2010). Syndapine besitzen wichtige Funktionen in der Modulierung des Aktinzytoskeletts (Qualmann et al. 1999, Sumoy et al. 2001, Qualmann und Kelly 2000, Kessels und Qualmann 2002). Das Aktinzytoskelett ist u.a. an der Ausbildung

von, für die Embryonalentwicklung bedeutende, Zelladhäsionen essenziell beteiligt. Adhärenz-Verbindungen sind am apikalen Ende von Neuroepithelzellen dafür verantwortlich, benachbarte Neuroepithelzellen sowie einen Teil ihrer nachfolgenden Radialgliazellen und Intermediärgliazellen miteinander zu verknüpfen und somit die strukturelle Integrität des Kortex gegenüber dem umliegenden Gewebe zu gewährleisten (Collins und Fleming 1995, Aaku-Saraste et al. 1996, Florio und Huttner 2014). Es wurde bereits gezeigt, dass Störungen der Adhärenz-Verbindungen, z.B. durch einen Mangel ihrer Strukturproteine, zu massiven Schäden in der embryonalen Gehirnentwicklung sowie abnormaler Proliferation neuronaler Vorläuferzellen führen können (Katayama et al. 2011, Li et al. 2003, Lien et al. 2006, Kadowaki et al. 2007). Syndapin II hemmt die Internalisierung von Cadherinen, welche wichtige Strukturproteine der Adhärenz-Verbindungen darstellen, und ist somit für der Formierung von Adhärenz-Verbindungen fundamental (Dorland et al. 2016, Malinova und Huveneers 2018). Polarisierte Cadherin-reiche Membranvorwölbungen gewährleisten eine korrekte kollektive Zellmigration während der embryonalen Entwicklung (Hayer et al. 2016). Syndapin II besitzt demnach einen wichtigen Einfluss auf die Zytokinese, welcher möglicherweise auch auf das Familienmitglied Syndapin III zu übertragen ist und eine putative gestörte Führung polarisierter Adhärenz-Verbindungen als Ursache für die Abweichungen der Vorläuferzellen im Syndapin III KO im Vergleich zu WT vermuten lässt. Somit könnten Veränderungen des Aktinzytoskeletts bei Syndapin III Defizienz Störungen in Adhärenz-Verbindungen bedingen, die in abweichenden Vorläuferzellzahlen und somit einer veränderten Kortikogenese resultieren. Syndapin III könnte einen putativen Einfluss auf Bildungs-, Reifungs- und Erhaltungsprozesse neuronaler Vorläuferzellen besitzen. Überdies ist ein Einfluss von Syndapin III auf die korrekte Teilung und Differenzierung der Vorläuferzellen möglich. Interessant wären in diesem Zusammenhang weitergehende Untersuchungen der Adhärenz-Verbindungen in Syndapin III KO Mäusen. Western-Blot Analysen könnten Veränderungen der Expressionslevel der notwendigen Strukturproteine und somit Auswirkungen der Syndapin III Defizienz auf Adhärenz-Verbindungen quantifizieren. Neuere Expressionsstudien zeigten, dass Syndapin III im murinen Gehirn bereits pränatal in nachweisbaren Mengen vorliegt (Daten nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Sarah Krüger, Institut für Biochemie I, UKJ). Analysen von Edeling et al. (2009) erwiesen, dass ein *knockdown* von Syndapin III durch Morpholino in Zebrafischembryonen zu Störungen der Entwicklung führte (Edeling et al. 2009). Es

wurde eine wichtige Rolle von Syndapin III in der Regulierung der Zellpolarität und der Zellmigration während der frühen embryonalen Organisation der Chorda dorsalis im Zebrafisch gezeigt (Edeling et al. 2009). *Drosophila* besitzen nur ein Syndapin Protein (Kumar et al. 2009). Durch eine Expression von *Drosophila* Syndapin konnten die detektierten Auswirkungen des *knockdowns* durch Morpholino in Zebrafischembryonen wieder normalisiert werden. Dabei war insbesondere die in *Drosophila* Syndapin vorhandene N-terminale *extended FCH* (Fes/CIP4 Homologie) (EFC)-Domäne beteiligt, da sie ähnlich wie die F-BAR Domäne in den humanen Syndapin-Isoformen durch ihre Verknüpfung von Membranen mit C-terminaler Proteininteraktion eine korrekte Endozytose gewährleistet. Somit wurde Syndapin III eine fundamentale Rolle in der Verknüpfung von Migration, Endozytose und Zellspezifizierung während der embryonalen Morphogenese nachgewiesen (Edeling et al. 2009). Die in Zebrafischen detektierten Störungen der Zytokinese sind möglicherweise auf Säugetiere übertragbar und bekräftigen die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass Syndapin III einen embryonalen Einfluss auf die kortikale murine Gehirnentwicklung ausübt und somit die Proliferation und Differenzierung von embryonalen neuronalen Vorläuferzellen mit bedingt. Das Kortexwachstum ist abhängig von der Quantität der Vorläuferzellen, sodass bereits geringe Veränderungen in der Produktion von Progenitorzellen und Neuronen zu dramatischen Auswirkungen in der kortikalen Oberfläche führen können (Rakic 1995). Im Syndapin III KO wurden im Vergleich zum WT keine Veränderungen der Gesamtzellzahl bzw. der Kortikalen Wand ermittelt. Weitere Messungen des Gehirngewichtes wären jedoch interessant, um zu überprüfen, ob die ermittelten Abweichungen der neuronalen Zelldichten diverser Marker sowie die relative Expansion der Kortikalen Platte trotzdem mit einem veränderten Gehirngewicht korrelieren.

8.2.2 Der Einfluss von Syndapin III auf embryonale Nervenzellen des Kortex

Zwischen dem embryonalen Tag E13 und E15 kommt es zu einem kortikalen Wandel in der Neurogenese. Während zuvor die Generierung von Neuronen zukünftiger tiefer Schichten stattfand, differenzieren sich ab diesem Zeitpunkt Vorläuferzellen zu Neuronen postnataler hoher Schichten (Dominguez et al. 2013). Die Progenitorzellen für Neurone der Schichten II-IV werden ab dem Tag E13,5 gebildet (Molyneaux et al. 2007) (Abb. 1B). Im Vergleich der Genotypen konnte unter Anwendung des Antikörpers Brn2 am Tag E14,5, konträr zu der erhöhten Dichte von Ctip2+ Neuronen späte-

rer tiefer Schichten, eine um ungefähr 17% verminderte Dichte Brn2+ Zellen im Syndapin III KO im Vergleich zu WT detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt markiert der Antikörper Brn2 die Progenitorzellen der Neurone der zukünftigen Schicht II/III sowie post-mitotische Neurone, die in der Intermediärzone lokalisiert sind und zu den hohen kortikalen Schichten migrieren (Hagino-Yamagishi et al. 1997, McEvilly et al. 2002, Dominguez et al. 2013). Des Weiteren färbt der Antikörper Brn2 einen geringen Anteil von Projektionsneuronen der Schicht V, welche bereits zu ihrer finalen Position im Kortex migriert sind (Dominguez et al. 2013).

Als mögliche Erklärung für die detektierten Effekte der Ctip2+ Zelldichte wurde in dieser Arbeit dargeboten, dass sich Vorläuferzellen im Syndapin III KO in der frühen Embryonalentwicklung überzählig in Neurone der tiefen Schichten differenzieren, sodass zum Tag E14,5 ein Mangel an Progenitorzellen resultiert. Infolgedessen könnten die Vorläuferzellen für die Neurone zukünftiger hoher Schichten fehlen. Überdies wären immunfluoreszente Analysen vor E14,5 geeignet, um die Vorläuferzell-dichte zu früheren embryonalen Zeitpunkten zu überprüfen und anschließend mit den Auswirkungen auf die veränderte Zelldichte zum Tag E14,5 zu verknüpfen.

Im Gehirn ist Brn2 ein positiver Regulator von Genen, die in Radialgliazellen exprimiert werden, wie z.B. Sox2 (Catena et al. 2004). Die detektierten Veränderungen der Dichte der Tbr2+ Zellen, welche direkte Nachfolger der Sox2 Zellen sind, sowie der Dichte Brn2+ Zellen zum Tag E14,5 lassen Abweichung in Sox2+ Radialgliazellen vermuten. Die Färbung mit dem Antikörper Sox2 zum Tag E14,5 zeigte im Syndapin III KO verglichen mit WT Tendenzen zu einer Verringerung der Dichte der gefärbten Zellen ohne statistische Signifikanz. Die Radialgliazellen sowie Intermediärgliazellen entstammen dem Neuroepithel und entwickeln sich in andere Vorläuferzellen, Projektionsneurone des Neokortex oder Astrogliazellen (Molyneaux et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass eine Verminderung von Sox2 in neuronalen Vorläuferzellen zu einem früheren Austritt der Zellen aus ihrem Zellzyklus und somit zu einer früheren Differenzierung von Neuronen führt (Bylund et al. 2003). Diese Beobachtungen sind konsistent zu den Ergebnissen dieser Arbeit und könnten eine alternative potenzielle Erklärung für die detektierte erhöhte Dichte der Neurone tiefer Schichten im Syndapin III KO zum Tag E14,5 darstellen.

In den durchgeführten Analysen wurde als weiterer Untersuchungszeitpunkt der Embryonalentwicklung der Tag E18,5 ausgewählt. Durch den Vergleich eines Zeitpunktes, an dem ein Großteil der Neurogenese normalerweise bereits abgeschlos-

sen ist, sollte überprüft werden, inwieweit es sich bei den Effekten zum Tag E14,5 um eine entwicklungsbedingte temporäre oder eine anhaltende Veränderung handelte. Des Weiteren konnte anhand der Analyse eines zweiten Entwicklungszeitpunktes ermittelt werden, ob detektierte Abweichungen im Syndapin III KO zu späteren Zeitpunkten kompensiert werden. Nissl-Färbungen des Neokortex visualisierten auch zum Tag E18,5 eine veränderte Organisation des Kortex im Syndapin III KO verglichen mit WT. Die relative Ausdehnung der Kortikalen Platte, bezogen auf die Kortikale Wand, erwies sich im Syndapin III KO verglichen mit WT um 14% vermindert. Analysen der Dichte der Neurone der kortikalen Schicht V und der kortikalen Schicht VI im Vergleich der Genotypen zum Zeitpunkt E18,5 akzentuierten im Syndapin III KO verglichen mit WT eine Verminderung der zum Tag E14,5 erhöhten Dichte der Nervenzellen tiefer Schichten in der Ctip2-Färbung um nahezu 25% sowie eine reduzierte Zelldichte in der Färbung des erst ab E18,5 exprimierten Transkriptionsfaktors FoxP2 um ungefähr 16%. Auffällig war, dass sich das Detektionssignal von FoxP2 sehr ausgedehnt über den Kortex verteilte (Abb. 14). Diese Beobachtung ist dadurch zu begründen, dass die kortikale Schicht VI in zwei Abschnitte untergliedert werden kann. Der obere Anteil, auch bezeichnet als Schicht VIa, besitzt viele Nervenzellen, während der untere Anteil, Schicht VIb, weniger Neurone, jedoch viele Axone besitzt und nicht zur Kortikalen Platte gehört, sondern seinen embryonalen Ursprung bereits vor der Entstehung der Neurone der Kortikalen Platte hat (Marín-Padilla 1978). Schicht VIb erstreckt sich bis in die Intermediärzone (Marin-Padilla 1978). Demzufolge existieren auch migrierende Neurone unterhalb der Kortikalen Platte in der Intermediärzone, die möglicherweise von dem Antikörper FoxP2 mit angefärbt werden und die ausgedehnte FoxP2+ Zelldichte verursachen. Ein potenzieller Mechanismus, der die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Abnahme der Neurone tiefer Schichten im Syndapin III KO im Vergleich zum WT zum Tag E18,5 auslöst, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise wurde die initial zu dick angelegte Kortikale Platte im Syndapin III KO durch eine darauffolgende reduzierte Bildung neu entstehender Neurone oder durch eine Eliminierung der initial existenten Neurone und darauffolgende verminderte Generierung neuer Neurone im Syndapin III KO kompensiert. Analysen zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wären geeignet, um das stattfindende Ausmaß der Apoptose festzustellen. Es wurde bereits gezeigt, dass neuronale Strukturen dynamisch sind und sich beispielweise exzitatorische Nervenzellen in inhibitorische Interneurone weiterentwickeln können (De la Rossa et al. 2013). Überdies erschien

eine putative Störung der Differenzierung der in der Embryonalentwicklung früh produzierten Neurone sowie eine fehlgeleitete Migration der Neurone aufgrund der verminderten Gliazellen möglich.

Auch in der immunfluoreszenten Analyse der Zelldichten von Vorläuferzellen zeigten sich gegensätzliche Effekte im Vergleich der beiden untersuchten Zeitpunkte dieser Arbeit. Am Tag E18,5 konnte eine signifikante, gegenüber dem Tag E14,5 konträre, deutliche Erhöhung der Dichte der Tbr2+ Intermediärgliazellen um über 50% im Syndapin III KO verglichen mit WT ermittelt werden. Sox2+ Zellen verzeichneten einen signifikanten Anstieg der Dichte um nahezu 49% in den durchgeführten immunfluoreszenten Analysen zum Tag E18,5 im Syndapin III KO verglichen mit WT. Die detektierten Veränderungen des Tbr2+ und Sox2+ Signals im Syndapin III KO verglichen mit WT zum Tag E18,5 bekräftigten die vorgeschlagene putative Rolle von Syndapin III in Proliferationsprozessen von neuronalen Vorläuferzellen und konsolidierten eine Störung in der präzisen Differenzierung dieser Zellen im Syndapin III KO. Progenitorzellen residieren in der Ventrikularzone sowie Subventrikularzone und produzieren im murinen Gehirn Projektionsneurone der verschiedenen kortikalen Schichten in einem engen, zeitlich kontrollierten Rahmen vom embryonalen Tag E11,5 bis E17,5 (Rakic 1974). Normalerweise werden Neurone hoher kortikaler Schichten in einem zeitlichen Rahmen zwischen dem embryonalen Tag E13,5 bis E16,5 generiert (Molyneaux et al. 2007). Frühe Vorläuferzellen der Embryonalentwicklung vor dem Tag E13,5 sind sehr flexibel in ihrer Differenzierung, sie formen Neurone tiefer kortikaler Schichten, sind aber auch in der Lage, Neurone höherer kortikaler Schichten zu generieren. Dem entgegen besitzen spät auftretende Progenitorzellen ab dem Tag E13,5 eine geringere Plastizität und folglich weniger Möglichkeiten in der weiteren Differenzierung (Molyneaux et al. 2007). Die Reduzierung der Dichte der Nervenzellen tiefer kortikaler Schichten bei gleichzeitig erhöhter Vorläuferzellendichte zum Tag E18,5 im Syndapin III KO könnte darin begründet sein, dass die Vorläuferzellen zu diesem Zeitpunkt in ihrer zukünftigen Entwicklung nicht mehr so flexibel wie zu früheren Zeitpunkten der Embryonalentwicklung sind und somit vorwiegend Neurone zukünftiger hoher kortikaler Schichten ausbilden. Zur Quantifizierung der Neurone postnataler hoher kortikaler Schichten II-IV wurde zum Zeitpunkt E18,5 der Antikörper Cux1 verwendet, welcher erst ab dem Tag E16,5 valide Ergebnisse liefert (Nieto et al. 2004) und keine signifikanten Veränderungen der Zelldichte im Vergleich der Genotypen zum Tag E18,5 zeigte. Hingegen verzeichnete die

immunfluoreszente Färbung Brn2⁺ Zellen im Syndapin III KO im Vergleich zum WT zu diesem Zeitpunkt eine um ungefähr 21% erhöhte Zelldichte. Da der Antikörper Brn2 hauptsächlich intrakortikale Projektionsneurone der hohen Schichten markiert und nur zu einem geringen Anteil Neurone der Schicht V anfärbt (Dominguez et al. 2013), kann anhand der detektierten erhöhten Brn2⁺ Zelldichte bei gleichzeitiger Reduktion der Zelldichte Ctip2⁺ und FoxP2⁺ Zellen angenommen werden, dass die Neurone der Schicht II/III zum Tag E18,5 im Syndapin III KO verglichen mit WT erhöht sind. Die Brn2 Expression korreliert zeitlich eng mit dem Beginn der Generierung von Neuronen zukünftiger hoher Schichten. Ein Anstieg des Transkriptionsfaktors ist assoziiert mit einem Abschluss der Generierung von Neuronen postnataler tiefer kortikaler Schichten und dem Beginn der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neuronen späterer hoher kortikaler Schichten (Dominguez et al. 2013). Die Analyse der Dichte der Vorläuferzellen ergab im Syndapin III KO im Vergleich zum WT ein Anstieg zum Tag E18,5. Normalerweise kommt es im fortschreitenden Verlauf der Neurogenese bei der Entwicklung der Vorläuferzellen zu einem Wechsel von proliferativen Prozessen zu Differenzierungsprozessen (Götz und Huttner 2005). Eine erneute Zunahme der Vorläuferzellzahlen könnte mit einer Generierung von Neuronen zu späteren Zeitpunkten als dem normalen Zeitrahmen E13,5 bis E16,5 (Molyneaux et al. 2007) in der Embryonalentwicklung im Syndapin III KO assoziiert sein und die gesteigerte Dichte Brn2⁺ Zellen zum Zeitpunkt E18,5 mit bedingen. Möglicherweise werden durch eine verspätete Generierung neuer Neurone im Syndapin III KO die im Vergleich der Genotypen zuvor detektierten abweichenden Zelldichten kompensiert und somit der milde adulte Phänotyp der Syndapin III KO Mäuse evoziert. Da bereits zum Zeitpunkt E14,5 eine vorzeitige Generierung von Neuronen tiefer kortikaler Schichten vermutet wurde, könnte die Syndapin III Defizienz putativ zu Veränderungen der zeitlichen Abläufe der Neurogenese führen. Analysen der Neuronenanzahl bzw. Neuronendichte im adulten Syndapin III KO verglichen mit WT wären geeignet, um die zum Ende der Embryonalentwicklung ermittelten Abweichungen der Zelldichten von neuronalen Vorläuferzellmarkern und Schichtenmarkern zu postnatalen Zeitpunkten zu überprüfen.

Bei dem Großteil der mit den neuronalen Schichtenmarkern markierten Zellen handelt es sich um Neurone, die während der Embryonalentwicklung in die Kortikale Platte migrieren (Marín-Padilla 1978). Eine Verknüpfung der Lokalisation immunfluoreszent markierter Zellen im Kortex und der relativen Ausdehnung der Kortikalen

Platte wurde in der Arbeit nicht durchgeführt, da die koronalen verwendeten Gehirnschnitte der Nissl-Färbungen und immunfluoreszenten Färbungen nicht exakt an der gleichen Stelle in der Frontalebene lokalisiert waren. Interessant wäre eine Analyse der exakten Lokalisierung der positiv-gefärbten Zellen im Kortex und eine Zuordnung zum entsprechenden Abschnitt der Kortalen Wand, um zu überprüfen, ob die verminderte Zelldichte der Neurone zukünftiger hoher Schichten mit einer verzögerten Migration der Nervenzellen korreliert. Eine unabgeschlossene Migration der Nervenzellen würde die Hypothese dieser Arbeit, dass die Neurone zukünftiger hoher Schichten im Syndapin III KO verglichen mit WT später in der Entwicklung entstehen, bekräftigen. Wie in Abb. 15 und 16 repräsentativ für die Färbungen dieser Arbeit angedeutet, zeigen die Brn2⁺ und Cux1⁺ Zellen ein ausgedehnteres Detektionssignal im Syndapin III KO als im WT, sodass möglicherweise die Neurone im WT bereits in der Kortalen Platte lokalisiert sind, während die Neurone im Syndapin III KO noch zu dieser migrieren.

Es wurde bereits gezeigt, dass Mitglieder derselben Proteinfamilie redundante Funktionen besitzen und somit zur Kompensation einer gegenseitigen Defizienz befähigt sind (Lijam et al. 1997, Belinson et al. 2016). Angesichts vieler struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten der Syndapin-Isoformen (Modregger et al. 2000, Plomann et al. 1998, Qualmann et al. 1999, Ritter et al. 1999, Itoh et al. 2005, Kessels und Qualmann 2006) war eine putative Kompensation des Verlustes von Syndapin III durch seine Familienmitglieder zumindest partiell anzunehmen. In Übereinstimmung zu dieser Vermutung wurde aufgrund möglicher Redundanz der Syndapin-Proteine eine gegenseitige Kompensation der verschiedenen Familienmitglieder bereits untersucht (Koch et al. 2011, Del Pino et al. 2014, Seemann et al. 2017). Da sowohl eine verstärkte Expression als auch ein putativer Verlust eines der anderen Proteine der Syndapin-Familie die Defizienz eines Familienmitglieds kompensieren könnte, wurden Analysen zur Expression der Syndapin-Isoformen durchgeführt. Expressionsanalysen in Gehirnhomogenaten von Syndapin I KO Mäusen zeigten keine veränderte Expression der neuronalen Syndapin-Isoformen im Vergleich zu WT und infolgedessen keine Kompensation der Syndapin I Defizienz durch andere Mitglieder der Syndapin-Familie (Koch et al. 2011). Konsistent dazu waren Western-Blot Analysen von Seeman et al. (2017) in Syndapin III KO Mäusen verglichen mit WT. Diese zeigten, dass sowohl das neuronal exprimierte Syndapin I im Skelettmuskel, Herz, Leber und Gehirn als auch das ubiquitär exprimierte Syndapin II in Skelettmuskel und Herz

keine veränderten Expressionslevel im Syndapin III KO verglichen mit WT besaßen und somit die anderen Syndapin-Isoformen die durch Syndapin III Defizienz vermittelte Verminderung der Dichte von Caveolen im Skelettmuskel nicht kompensieren können (Seemann et al. 2017). Eine putative Kompensation der verschiedenen Mitglieder der Syndapin-Familie erscheint daher unwahrscheinlich. Syndapin I ist in Hirnstamm- und Rückenmarksneuronen bereits ab dem Tag E14,5 vorhanden und trägt zur korrekten Ausbildung von synaptischen Glycinrezeptoren bei (Del Pino et al. 2014). Interessanterweise wurde Syndapin I im Gehirn in bisherigen Western-Blot Analysen erst ab dem embryonalen Tag E17 in nachweisbaren Mengen detektiert (Plomann et al. 1998), was die in den Experimenten dieser Arbeit ermittelten konträren kortikalen Veränderungen im Vergleich der Genotypen zum Tag E18,5, im Gegensatz zu E14,5, möglicherweise partiell beeinflussen könnte.

Zusammengenommen sind bei Syndapin III Defizienz zahlreiche strukturelle kortikale Veränderungen während der Embryonalentwicklung detektiert worden. Weiterführende, zukünftige MRT-Bildgebungsanalysen der embryonalen Syndapin III KO Mäuse wären interessant, um ein besseres Verständnis der gesamten Gehirnstruktur der Syndapin III KO Mäuse in Korrelation mit den beobachteten Effekten zu erhalten.

Da bereits kleine Veränderungen oder Fehlfunktion während der Entwicklung zu gravierenden neurologischen Defiziten führen können und selbst ein transienter Phänotyp während der Entwicklung einen prägenden Einfluss auf das adulte Sozialverhalten haben kann (Normand et al. 2013, Belinson et al. 2016, Forrest et al. 2018), ergeben sich für die in der Arbeit gezeigten kortikalen Veränderungen bei Syndapin III Defizienz während der Embryonalentwicklung im Vergleich zu WT eine besondere Relevanz. Die Syndapin III vermittelten Effekte auf embryonale Nervenzellen lassen einen putativen Einfluss von Syndapin III in pränatalen Reifungsprozessen und ferner resultierende Abweichungen in der Ausbildung kortikaler Netzwerke vermuten. Sozialverhalten wird durch kortikale Integration verschiedener neuronaler kognitiver Prozesse wie beispielsweise Wahrnehmung, Erkennung und Bewertung des sozialen Umfelds gewährleistet (Frith und Frith 2007). Regionen des Temporallappens interagieren dafür insbesondere mit einem Netzwerk von kortikalen zerebralen Strukturen und Amygdala, welche zerebrale ausübende Systeme, wie insbesondere Motorkortex sowie Basalganglien, und Emotionen-steuernde Regionen, wie Hypothalamus und Periaquäduktales Grau des Hirnstamms, aktivieren (Adolphs 1999, Adolphs 2001). Nur mittels physiologischer Interaktion einer Vielzahl zerebraler Strukturen kann

soziale Wahrnehmung mit sozialem Verhalten verknüpft und somit eine adäquate Interaktion gewährleistet werden (Kilford et al. 2016). Die strukturellen Veränderungen im Kortex von Syndapin III KO Mäusen zu embryonalen Zeitpunkten könnten, auch wenn sie möglicherweise von transienter Dauer sind, funktionelle Auswirkungen besitzen und somit potenziell den adulten Verhaltensphänotyp der Syndapin III KO Mäuse erklären. Zusätzlich zu dem direkten Einfluss der postsynaptischen strukturellen Veränderungen bei Syndapin III Defizienz auf die Integration der Information verschiedener neuronaler Netzwerke ist es möglich, dass auch die im adulten Syndapin III KO detektierte veränderte Struktur der Postsynapse durch die abweichende Embryonalentwicklung mit bedingt ist. Denkbar wäre überdies eine Kompensation der embryonalen neuronalen Veränderungen der Zelldichte verschiedener neuronaler Vorläuferzell- und Schichtenmarker durch Variierung der dendritischen Verknüpfungen.

9 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst konnten im Rahmen dieser Arbeit kortikale Auswirkungen bei Syndapin III Defizienz sowie eine Partizipation von Syndapin III in der Ausbildung neuronaler Morphologien gezeigt werden. Anhand quantitativer Analysen dendritischer Dornfortsätze von Pyramidenzellen der Kortexschichten II/III und V adulter Syndapin III KO Mäuse im Vergleich zu WT ließ sich erstmalig eine Involvierung des Proteins in die postsynaptische kortikale strukturelle Organisation nachweisen. Insbesondere war die Dornenkopfmorphologie, Dornenlänge und Dichte reiferer Dornen verändert. Signifikante Längeneffekte zeigte auch die filopodienähnliche unreife Dornenklasse, welche im Syndapin III KO im Vergleich zu WT verhältnismäßig überrepräsentiert war. Die präzise Dichte sowie exakte Morphologie dendritischer Dornfortsätze sind essenziell für physiologische Gehirnfunktionen. Strukturelle Veränderungen sowie abweichende Dichten dendritischer Dornfortsätze wurden bereits bei zahlreichen neurodegenerativen Prozessen sowie neurologischen Erkrankungen beobachtet und eine klinische Relevanz von dendritischen Dornfortsätzen beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit ließen eine putative Rolle von Syndapin III in Bildungs- und Reifungsprozessen dendritischer Dornen sowie eine pathophysiologische Bedeutung von Syndapin III im Kortex vermuten und bilden die Basis für zukünftige funktionelle Untersuchungen. Die Verringerung der Dornendichte im Syndapin III KO im Vergleich zu WT belegte überdies eine veränderte Architektur des zerebralen Kortex im adulten Syndapin III KO und verdeutlichte einen Einfluss von Syndapin III auf die synaptische Konnektivität. Darüber hinaus ergaben erstmalige Untersuchungen zu Auswirkungen einer embryonalen Syndapin III Defizienz Veränderungen bei der Embryonalentwicklung neuronaler kortikaler Strukturen. Histologische Analysen des zerebralen Kortex enthüllten im Syndapin III KO verglichen mit WT eine veränderte relative Expansion der Kortikalen Platte sowie abweichende Zelldichten unter Verwendung von Vorläuferzell- und Schichtenmarkern zum Tag E14,5 und E18,5. Von elementarer Bedeutung für neuronale Netzwerke ist die korrekte Ausbildung von Neuronen und ihren synaptischen Verbindungen. Es ist denkbar, dass die detektierten strukturellen Veränderungen im Syndapin III KO die Verknüpfung der Informationen neuronaler Netzwerke und somit adäquate komplexe Verarbeitungsprozesse beeinflussen sowie die Ausprägung des adulten Phänotyps hervorrufen. Demzufolge hat diese Arbeit dazu beigetragen, eine zuvor unbekannte kortikale Relevanz von Syndapin III in der Embryonalentwicklung sowie in der adulten strukturellen

Organisation von Postsynapsen aufzudecken.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol*, 180 (2):664-679.

Adelsberger-Mangan DM, Levy WB. 1993. Adaptive synaptogenesis constructs networks that maintain information and reduce statistical dependence. *Biol Cybern*, 70 (1):81-87.

Adolphs R. 1999. Social cognition and the human brain. *Trends Cogn Sci*, 3 (12):469-479.

Adolphs R. 2001. The neurobiology of social cognition. *Curr Opin Neurobiol*, 11 (2):231-239.

Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131 (2):337-350.

Amunts K, Schleicher A, Burgel U, Mohlberg H, Uylings HB, Zilles K. 1999. Broca's region revisited: cytoarchitecture and intersubject variability. *J Comp Neurol*, 412 (2):319-341.

Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK. 2002. Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo. *Cereb Cortex*, 12 (7):702-709.

Andersson F, Jakobsson J, Löw P, Shupliakov O, Brodin L. 2008. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *J Neurosci*, 28 (15):3925-3933.

Angevine JB, Jr., Sidman RL. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192:766-768.

Anggono V, Smillie KJ, Graham ME, Valova VA, Cousin MA, Robinson PJ. 2006. Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat Neurosci*, 9 (6):752-760.

Anggono V, Koc-Schmitz Y, Widagdo J, Kormann J, Quan A, Chen CM, Robinson PJ, Choi SY, Linden DJ, Plomann M, Huganir RL. 2013. PICK1 interacts with PACSIN to regulate AMPA receptor internalization and cerebellar long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (34):13976-13981.

Araya R, Jiang J, Eiselthaler KB, Yuste R. 2006. The spine neck filters membrane potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (47):17961-17966.

Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R, Macklis JD. 2005. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45 (2):207-221.

Arnold SE, Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR. 1991. Some cytoarchitectural abnormalities of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 48 (7):625-632.

Augustinack JC, van der Kouwe AJ, Blackwell ML, Salat DH, Wiggins CJ, Frosch MP, Wiggins GC, Potthast A, Wald LL, Fischl BR. 2005. Detection of entorhinal layer II using 7 Tesla [corrected] magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 57 (4):489-494.

Belinson H, Nakatani J, Babineau BA, Birnbaum RY, Ellegood J, Bershteyn M, McEvelly RJ, Long JM, Willert K, Klein OD, Ahituv N, Lerch JP, Rosenfeld MG, Wynshaw-Boris A. 2016. Prenatal beta-catenin/Brn2/Tbr2 transcriptional cascade regulates adult social and stereotypic behaviors. *Mol Psychiatry*, 21 (10):1417-1433.

Bellot A, Guivernau B, Tajés M, Bosch-Morató M, Valls-Comamala V, Muñoz FJ. 2014. The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines. *Brain Res*, 1573:1-16.

Berkel S, Tang W, Treviño M, Vogt M, Obenaus HA, Gass P, Scherer SW, Sprengel R, Schratt G, Rappold GA. 2012. Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology. *Hum Mol Genet*, 21 (2):344-357.

Bhatt DH, Zhang S, Gan WB. 2009. Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol*, 71:261-282.

Blanpied TA, Ehlers MD. 2004. Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biol Psychiatry*, 55 (12):1121-1127.

Bliss TV, Lømo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232 (2):331-356.

Blomberg F, Cohen RS, Siekevitz P. 1977. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. II. Characterization and arrangement of some of the major proteins within the structure. *J Cell Biol*, 74 (1):204-225.

Bourne JN, Harris KM. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 31:47-67.

Braun A, Pinyol R, Dahlhaus R, Koch D, Fonarev P, Grant BD, Kessels MM, Qualmann B. 2005. EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. *Mol Biol Cell*, 16 (8):3642-3658.

Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*, 6 (11):1162-1168.

Carlson BR, Lloyd KE, Kruszewski A, Kim IH, Rodriguez RM, Heindel C, Faytell M, Dudek SM, Wetsel WC, Soderling SH. 2011. WRP/srGAP3 facilitates the initiation of spine development by an inverse F-BAR domain, and its loss impairs long-term memory. *J Neurosci*, 31 (7):2447-2460.

Catena R, Tiveron C, Ronchi A, Porta S, Ferri A, Tatangelo L, Cavallaro M, Favaro R, Ottolenghi S, Reinbold R, Schöler H, Nicolis SK. 2004. Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *J Biol Chem*, 279 (40):41846-41857.

Caviness VS, Jr. 1982. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res*, 256 (3):293-302.

Caviness VS, Jr., Takahashi T. 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev*, 17 (3):159-163.

- Chang FL, Greenough WT. 1984. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res*, 309 (1):35-46.
- Choi C, Benveniste EN. 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*, 44 (1):65-81.
- Cingolani LA, Goda Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, 9 (5):344-356.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*, 334:33-46.
- Collins JE, Fleming TP. 1995. Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time. *Trends Biochem Sci*, 20 (8):307-312.
- Conde C, Cáceres A. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 10 (5):319-332.
- Crick F. 1982. Do dendritic spines twitch? *Trends in Neurosciences*, 5:44-46.
- Cuajungco MP, Grimm C, Oshima K, D'Hoedt D, Nilius B, Mensenkamp AR, Bindels RJ, Plomann M, Heller S. 2006. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *J Biol Chem*, 281 (27):18753-18762.
- da Silva JS, Dotti CG. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci*, 3 (9):694-704.
- Dailey ME, Smith SJ. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, 16 (9):2983-2994.
- De la Rossa A, Bellone C, Golding B, Vitali I, Moss J, Toni N, Lüscher C, Jabaudon D. 2013. In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci*, 16 (2):193-200.

De Robertis ED, Bennett HS. 1955. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J Biophys Biochem Cytol*, 1 (1):47-58.

Dehay C, Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*, 8 (6):438-450.

Del Pino I, Koch D, Schemm R, Qualmann B, Betz H, Paarmann I. 2014. Proteomic analysis of glycine receptor beta subunit (GlyRbeta)-interacting proteins: evidence for syndapin I regulating synaptic glycine receptors. *J Biol Chem*, 289 (16):11396-11409.

Dharmalingam E, Haeckel A, Pinyol R, Schwintzer L, Koch D, Kessels MM, Qualmann B. 2009. F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *J Neurosci*, 29 (42):13315-13327.

Dominguez MH, Ayoub AE, Rakic P. 2013. POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 23 (11):2632-2643.

Dorland YL, Malinova TS, van Stalborch AM, Grieve AG, van Geemen D, Jansen NS, de Kreuk BJ, Nawaz K, Kole J, Geerts D, Musters RJ, de Rooij J, Hordijk PL, Huveneers S. 2016. The F-BAR protein pacsin2 inhibits asymmetric VE-cadherin internalization from tensile adherens junctions. *Nat Commun*, 7:12210.

Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (23):13438-13443.

Edeling MA, Sanker S, Shima T, Umasankar PK, Höning S, Kim HY, Davidson LA, Watkins SC, Tsang M, Owen DJ, Traub LM. 2009. Structural requirements for PACSIN/Syndapin operation during zebrafish embryonic notochord development. *PLoS One*, 4 (12):e8150.

Fatemi SH, Folsom TD. 2009. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull*, 35 (3):528-548.

- Ferland RJ, Cherry TJ, Preware PO, Morrissey EE, Walsh CA. 2003. Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. *J Comp Neurol*, 460 (2):266-279.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 18 (21):8900-8911.
- Fifková E, Delay RJ. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol*, 95 (1):345-350.
- Finlay BL, Darlington RB. 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*, 268 (5217):1578-1584.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, 20 (5):847-854.
- Fletcher DA, Mullins RD. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463 (7280):485-492.
- Florio M, Huttner WB. 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*, 141 (11):2182-2194.
- Forrest MP, Parnell E, Penzes P. 2018. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19:215.
- Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. 1996. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol*, 16 (6):2689-2699.
- Frith CD. 2007. The social brain? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 362 (1480):671-678.
- Frith CD, Frith U. 2007. Social cognition in humans. *Curr Biol*, 17 (16):R724-732.
- Frost A, Perera R, Roux A, Spasov K, Destaing O, Egelman EH, De Camilli P, Unger VM. 2008. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*, 132 (5):807-817.
- Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR. 1998. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65 (4):446-453.

Glantz LA, Lewis DA. 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 57 (1):65-73.

Goff DC, Coyle JT. 2001. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 158 (9):1367-1377.

Goley ED, Welch MD. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (10):713-726.

Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76:593-627.

Gordon-Weeks PR, Fournier AE. 2014. Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. *J Neurochem*, 129 (2):206-212.

Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (10):777-788.

Grabrucker AM, Knight MJ, Proepper C, Bockmann J, Joubert M, Rowan M, Nienhaus GU, Garner CC, Bowie JU, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Boeckers TM. 2011. Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J*, 30 (3):569-581.

Grant SG. 2012. Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol*, 22 (3):522-529.

Gray EG. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat*, 93:420-433.

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*, 14 (11):755-769.

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W-B. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420 (6917):812-816.

Guillemot F. 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol*, 83 (1):37-52.

- Haeckel A, Ahuja R, Gundelfinger ED, Qualmann B, Kessels MM. 2008. The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. *J Neurosci*, 28 (40):10031-10044.
- Hagino-Yamagishi K, Saijoh Y, Ikeda M, Ichikawa M, Minamikawa-Tachino R, Hamada H. 1997. Predominant expression of Brn-2 in the postmitotic neurons of the developing mouse neocortex. *Brain Res*, 752 (1-2):261-268.
- Harris KM, Stevens JK. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci*, 9 (8):2982-2997.
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 17:341-371.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*, 12 (7):2685-2705.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 (Pt 4):593-624.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Götz M. 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol*, 229 (1):15-30.
- Hayer A, Shao L, Chung M, Joubert LM, Yang HW, Tsai FC, Bisaria A, Betzig E, Meyer T. 2016. Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat Cell Biol*, 18 (12):1311-1323.
- Heng JI, Chariot A, Nguyen L. 2010. Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Trends Neurosci*, 33 (1):38-47.
- Hering H, Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2 (12):880-888.
- Hering H, Sheng M. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cofilin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci*, 23 (37):11759-11769.

Hevner RF, Hodge RD, Daza RA, Englund C. 2006. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res*, 55 (3):223-233.

Higgs HN, Pollard TD. 2000. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 150 (6):1311-1320.

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347 (6288):44-49.

Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10 (9):647-658.

Hopfield JJ. 1982. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (8):2554-2558.

Hotulainen P, Hoogenraad CC. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 189 (4):619-629.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpaa K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*, 185 (2):323-339.

Hou W, Izadi M, Nemitz S, Haag N, Kessels MM, Qualmann B. 2015. The Actin Nucleator Cobl Is Controlled by Calcium and Calmodulin. *PLoS Biol*, 13 (9):e1002233.

Hua JY, Smith SJ. 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci*, 7 (4):327-332.

Hutsler JJ, Zhang H. 2010. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*, 1309:83-94.

Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. 2005. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell*, 9 (6):791-804.

Jones EG, Powell TP. 1969. Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *J Cell Sci*, 5 (2):509-529.

- Junghans D, Hack I, Frotscher M, Taylor V, Kemler R. 2005. Beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. *Dev Dyn*, 233 (2):528-539.
- Kadowaki M, Nakamura S, Machon O, Krauss S, Radice GL, Takeichi M. 2007. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev Biol*, 304 (1):22-33.
- Kantor DB, Kolodkin AL. 2003. Curbing the excesses of youth: molecular insights into axonal pruning. *Neuron*, 38 (6):849-852.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26 (7):360-368.
- Katayama K-i, Melendez J, Baumann JM, Leslie JR, Chauhan BK, Nemkul N, Lang RA, Kuan C-Y, Zheng Y, Yoshida Y. 2011. Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (18):7607-7612.
- Kaufman M, Hrsg. 1999. *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Erste Aufl. San Diego: Elsevier.
- Kelly PT, Cotman CW. 1978. Synaptic proteins. Characterization of tubulin and actin and identification of a distinct postsynaptic density polypeptide. *J Cell Biol*, 79 (1):173-183.
- Kessels MM, Qualmann B. 2002. Syndapins integrate N-WASP in receptor-mediated endocytosis. *EMBO J*, 21 (22):6083-6094.
- Kessels MM, Qualmann B. 2004. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci*, 117 (Pt 15):3077-3086.
- Kessels MM, Qualmann B. 2006. Syndapin oligomers interconnect the machineries for endocytic vesicle formation and actin polymerization. *J Biol Chem*, 281 (19):13285-13299.
- Kessels MM, Qualmann B. 2015. Different functional modes of BAR domain proteins in formation and plasticity of mammalian postsynapses. *J Cell Sci*, 128 (17):3177-3185.

- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 11 (1):393-412.
- Kilford EJ, Garrett E, Blakemore SJ. 2016. The development of social cognition in adolescence: An integrated perspective. *Neurosci Biobehav Rev*, 70:106-120.
- Kim IH, Rossi MA, Aryal DK, Racz B, Kim N, Uezu A, Wang F, Wetsel WC, Weinberg RJ, Yin H, Soderling SH. 2015. Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine. *Nat Neurosci*, 18 (6):883-891.
- Klüver H, Bucy PC. 1997. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9 (4):606-620.
- Koch D, Spiwoks-Becker I, Sabanov V, Sinning A, Dugladze T, Stellmacher A, Ahuja R, Grimm J, Schüler S, Müller A, Angenstein F, Ahmed T, Diesler A, Moser M, Tom Dieck S, Spessert R, Boeckers TM, Fässler R, Hübner CA, Balschun D, Gloveli T, Kessels MM, Qualmann B. 2011. Proper synaptic vesicle formation and neuronal network activity critically rely on syndapin I. *EMBO J*, 30 (24):4955-4969.
- Kumar V, Alla SR, Krishnan K, Ramaswami M. 2009. Syndapin is dispensable for synaptic vesicle endocytosis at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Mol Cell Neurosci*, 40 (2-3):234-241.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*, 139 (9):1535-1546.
- Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. 1998. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell*, 9 (8):1951-1959.
- Lee SH, Dominguez R. 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*, 29 (4):311-325.
- Lei W, Omotade OF, Myers KR, Zheng JQ. 2016. Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 39:86-92.
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*, 404 (6780):876-881.

- Li HS, Wang D, Shen Q, Schonemann MD, Gorski JA, Jones KR, Temple S, Jan LY, Jan YN. 2003. Inactivation of Numb and Numbl like in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis. *Neuron*, 40 (6):1105-1118.
- Lien WH, Klezovitch O, Vasioukhin V. 2006. Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr Opin Cell Biol*, 18 (5):499-506.
- Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K, Stevens KE, Maccaferri G, McBain CJ, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A. 1997. Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell*, 90 (5):895-905.
- Long JM, LaPorte P, Paylor R, Wynshaw-Boris A. 2004. Expanded characterization of the social interaction abnormalities in mice lacking Dvl1. *Genes Brain Behav*, 3 (1):51-62.
- Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. 2011. Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 146 (1):18-36.
- Machesky LM, Insall RH. 1999. Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol*, 146 (2):267-272.
- Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127 (1):107-115.
- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA. 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science*, 242 (4875):81-84.
- Malinova TS, Huveneers S. 2018. Sensing of Cytoskeletal Forces by Asymmetric Adherens Junctions. *Trends in Cell Biology*, 28 (4):328-341.
- Mallamaci A, Stoykova A. 2006. Gene networks controlling early cerebral cortex arealization. *Eur J Neurosci*, 23 (4):847-856.
- Marin O, Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci*, 2 (11):780-790.

Marín-Padilla M. 1978. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)*, 152 (2):109-126.

Marín-Padilla M. 1992. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol*, 321 (2):223-240.

Mates SL, Lund JS. 1983. Spine formation and maturation of type 1 synapses on spiny stellate neurons in primate visual cortex. *J Comp Neurol*, 221 (1):91-97.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429:761.

Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290 (5492):754-758.

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K. 1982. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (23):7590-7594.

McEvelly RJ, de Diaz MO, Schonemann MD, Hooshmand F, Rosenfeld MG. 2002. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science*, 295 (5559):1528-1532.

McGlashan TH, Hoffman RE. 2000. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry*, 57 (7):637-648.

Metuzals J, Mushynski WE. 1974. Electron microscope and experimental investigations of the neurofilamentous network in Deiters' neurons. Relationship with the cell surface and nuclear pores. *J Cell Biol*, 61 (3):701-722.

Miki H, Miura K, Takenawa T. 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*, 15 (19):5326-5335.

Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. 1998. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 391 (6662):93-96.

- Mione MC, Danevic C, Boardman P, Harris B, Parnavelas JG. 1994. Lineage analysis reveals neurotransmitter (GABA or glutamate) but not calcium-binding protein homogeneity in clonally related cortical neurons. *J Neurosci*, 14 (1):107-123.
- Miyashita-Lin EM, Hevner R, Wassarman KM, Martinez S, Rubenstein JL. 1999. Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation. *Science*, 285 (5429):906-909.
- Modregger J, Ritter B, Witter B, Paulsson M, Plomann M. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci*, 113 Pt 24:4511-4521.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8 (6):427-437.
- Monuki ES, Walsh CA. 2001. Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci*, 4 Suppl:1199-1206.
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain*, 120 (Pt 4):701-722.
- Muller D, Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S. 2002. LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med*, 2 (7):605-611.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (11):6181-6186.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 3 (6):423-432.
- Nieto M, Monuki ES, Tang H, Imitola J, Haubst N, Khoury SJ, Cunningham J, Gotz M, Walsh CA. 2004. Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 479 (2):168-180.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 7 (2):136-144.

Normand EA, Crandall SR, Thorn CA, Murphy EM, Voelcker B, Browning C, Machan JT, Moore CI, Connors BW, Zervas M. 2013. Temporal and mosaic Tsc1 deletion in the developing thalamus disrupts thalamocortical circuitry, neural function, and behavior. *Neuron*, 78 (5):895-909.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, 21 (3):545-559.

O'Leary DD, Sahara S. 2008. Genetic regulation of arealization of the neocortex. *Curr Opin Neurobiol*, 18 (1):90-100.

Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y. 2007. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (15):6418-6423.

Palay SL. 1956. Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*, 2 (4 Suppl):193-202.

Parajuli LK, Tanaka S, Okabe S. 2017. Insights into age-old questions of new dendritic spines: From form to function. *Brain Res Bull*, 129:3-11.

Parnass Z, Tashiro A, Yuste R. 2000. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10 (5):561-568.

Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P. 2002. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett*, 513 (1):92-97.

Peca J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z, Feng G. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472 (7344):437-442.

Pennington K, Beasley CL, Dicker P, Fagan A, English J, Pariante CM, Wait R, Dunn MJ, Cotter DR. 2008. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 13 (12):1102-1117.

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14 (3):285-293.

Pérez-Otaño I, Luján R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, Jones EG, Heinemann SF, Lo DC, Ehlers MD. 2006. Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci*, 9 (5):611-621.

Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*, 127 (4):321-355.

Pickrodt K. 2017. Die Konsequenzen einer Cobl Defizienz für die strukturelle Organisation des murinen Neokortex in vivo [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Pinyol R, Haeckel A, Ritter A, Qualmann B, Kessels MM. 2007. Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PLoS One*, 2 (5):e400.

Plomann M, Lange R, Vopper G, Cremer H, Heinlein UA, Scheff S, Baldwin SA, Leitges M, Cramer M, Paulsson M, Barthels D. 1998. PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *Eur J Biochem*, 256 (1):201-211.

Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297 (5581):612-615.

Qualmann B, Kelly RB. 2000. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol*, 148 (5):1047-1062.

Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell*, 10 (2):501-513.

Quan A, Robinson PJ. 2013. Syndapin--a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *FEBS J*, 280 (21):5198-5212.

Rácz B, Weinberg RJ. 2008. Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *J Neurosci*, 28 (22):5654-5659.

Rakic P. 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*, 183 (4123):425-427.

- Rakic P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241 (4862):170-176.
- Rakic P. 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*, 18 (9):383-388.
- Rakic P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci*, 10 (10):724-735.
- Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS. 1986. Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*, 232 (4747):232-235.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. 2005. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry*, 10 (5):434-449.
- Rice D, Barone S, Jr. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3:511-533.
- Ritter B, Modregger J, Paulsson M, Plomann M. 1999. PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett*, 454 (3):356-362.
- Roach W, Plomann M. 2007. PACSIN3 overexpression increases adipocyte glucose transport through GLUT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 355 (3):745-750.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97 (2):221-231.
- Rudie JD, Brown JA, Beck-Pancer D, Hernandez LM, Dennis EL, Thompson PM, Bookheimer SY, Dapretto M. 2012. Altered functional and structural brain network organization in autism. *Neuroimage Clin*, 2:79-94.
- Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K. 2001. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 11 (3):349-356.
- Schael S, Nüchel J, Müller S, Petermann P, Kormann J, Pérez-Otaño I, Martínez SM, Paulsson M, Plomann M. 2013. Casein kinase 2 phosphorylation of protein kinase C and casein kinase 2 substrate in neurons (PACSIN) 1 protein regulates neuronal spine formation. *J Biol Chem*, 288 (13):9303-9312.

Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (7):4107-4112.

Schmeisser MJ, Ey E, Wegener S, Bockmann J, Stempel AV, Kuebler A, Janssen AL, Udvardi PT, Shiban E, Spilker C, Balschun D, Skryabin BV, Dieck S, Smalla KH, Montag D, Leblond CS, Faure P, Torquet N, Le Sourd AM, Toro R, Grabrucker AM, Shoichet SA, Schmitz D, Kreutz MR, Bourgeron T, Gundelfinger ED, Boeckers TM. 2012. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*, 486 (7402):256-260.

Schneider K, Seemann E, Liebmann L, Ahuja R, Koch D, Westermann M, Hübner CA, Kessels MM, Qualmann B. 2014. ProSAP1 and membrane nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function. *J Cell Biol*, 205 (2):197-215.

Schubert V, Da Silva JS, Dotti CG. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol*, 172 (3):453-467.

Schüler S, Hauptmann J, Perner B, Kessels MM, Englert C, Qualmann B. 2013. Ciliated sensory hair cell formation and function require the F-BAR protein syndapin I and the WH2 domain-based actin nucleator Cobl. *J Cell Sci*, 126 (Pt 1):196-208.

Schwintzer L, Koch N, Ahuja R, Grimm J, Kessels MM, Qualmann B. 2011. The functions of the actin nucleator Cobl in cellular morphogenesis critically depend on syndapin I. *EMBO J*, 30 (15):3147-3159.

Seemann E, Sun M, Krüger S, Tröger J, Hou W, Haag N, Schüler S, Westermann M, Hübner CA, Romeike B, Kessels MM, Qualmann B. 2017. Deciphering caveolar functions by syndapin III KO-mediated impairment of caveolar invagination. *Elife*, 6.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS. 1999. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 45 (1):17-25.

Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M. 2002. Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet*, 18 (12):643-650.

Sessa A, Ciabatti E, Drechsel D, Massimino L, Colasante G, Giannelli S, Satoh T, Akira S, Guillemot F, Broccoli V. 2017. The Tbr2 Molecular Network Controls Cortical

Neuronal Differentiation Through Complementary Genetic and Epigenetic Pathways. *Cereb Cortex*, 27 (12):5715.

Sheng M, Hoogenraad CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 76:823-847.

Shepherd GM. 1996. The dendritic spine: a multifunctional integrative unit. *J Neurophysiol*, 75 (6):2197-2210.

Sporns O. 2011. The human connectome: a complex network. *Ann N Y Acad Sci*, 1224:109-125.

Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5 (3):239-246.

Stiles J, Jernigan TL. 2010. The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, 20 (4):327-348.

Stilo SA, Murray RM. 2010. The epidemiology of schizophrenia: replacing dogma with knowledge. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12 (3):305-315.

Sudhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27:509-547.

Sumoy L, Pluvinet R, Andreu N, Estivill X, Escarceller M. 2001. PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene*, 262 (1-2):199-205.

Sur M, Leamey CA. 2001. Development and plasticity of cortical areas and networks. *Nat Rev Neurosci*, 2 (4):251-262.

Svoboda K, Tank DW, Denk W. 1996. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science*, 272 (5262):716-719.

Tackenberg C, Ghori A, Brandt R. 2009. Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 6 (3):261-268.

Tada T, Sheng M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 16 (1):95-101.

Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J Neurosci*, 13 (2):820-833.

Terashima T. 1995. Anatomy, development and lesion-induced plasticity of rodent corticospinal tract. *Neurosci Res*, 22 (2):139-161.

Thornhill PB, Cohn JB, Drury G, Stanford WL, Bernstein A, Desbarats J. 2007. A proteomic screen reveals novel Fas ligand interacting proteins within nervous system Schwann cells. *FEBS Lett*, 581 (23):4455-4462.

Trepel M, Hrsg. 2015. *Neuroanatomie. Struktur und Funktion. Sechste Aufl.* München: Elsevier.

Vasistha NA, García-Moreno F, Arora S, Cheung AF, Arnold SJ, Robertson EJ, Molnár Z. 2015. Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb Cortex*, 25 (10):3290-3302.

Volfovsky N, Parnas H, Segal M, Korkotian E. 1999. Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments. *J Neurophysiol*, 82 (1):450-462.

Wakita Y, Kakimoto T, Katoh H, Negishi M. 2011. The F-BAR Protein Rapostlin Regulates Dendritic Spine Formation in Hippocampal Neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (37):32672-32683.

Wegner AM, Nebhan CA, Hu L, Majumdar D, Meier KM, Weaver AM, Webb DJ. 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, 283 (23):15912-15920.

Wickens J. 1988. Electrically coupled but chemically isolated synapses: dendritic spines and calcium in a rule for synaptic modification. *Prog Neurobiol*, 31 (6):507-528.

Witte H, Bradke F. 2008. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol*, 18 (5):479-487.

Wonders CP, Anderson SA. 2006. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 7 (9):687-696.

Yuste R, Bonhoeffer T. 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 24:1071-1089.

Yuste R, Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*, 5 (1):24-34.

Ziv NE, Smith SJ. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17 (1):91-102.

11 Anhang

11.1 Zusätzliches Material

11.1.1 Bildmaterial

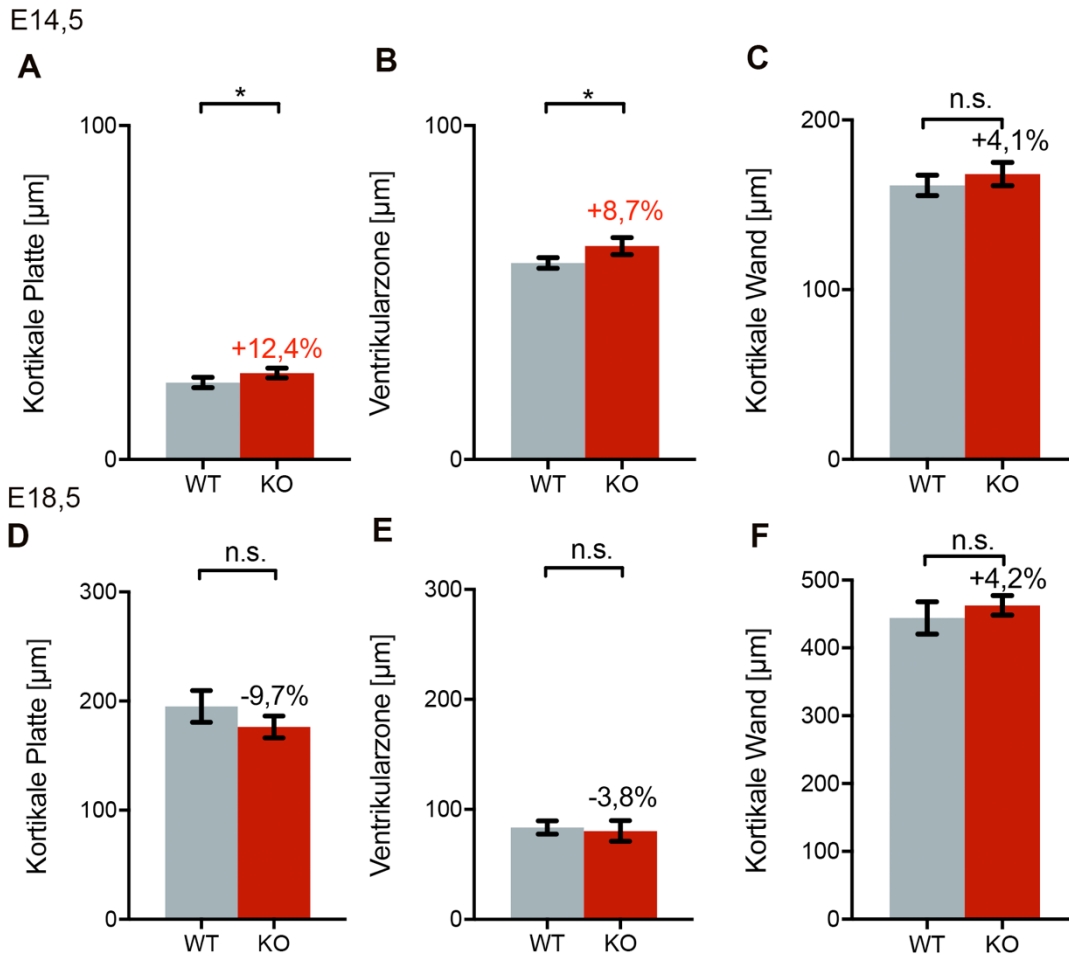


Abb. 20: Absolute Ausdehnung der Kortikalen Platte, Ventrikularzone und Kortikalen Wand. Dargestellt ist die statistische Auswertung der Ausdehnung der Kortikalen Platte (**A**), Ventrikularzone (**B**) und Kortikalen Wand (**C**) im Vergleich der Genotypen zum Zeitpunkt E14,5. Sowohl die Kortikale Platte (**A**) als auch die Ventrikularzone (**B**) verzeichneten zum Tag E14,5 eine signifikante Expansion im Syndapin III KO verglichen mit WT, während die Analyse der Ausdehnung der Kortikale Wand im Vergleich der Genotypen keine signifikanten Abweichungen zeigte (**C**). Die Auswertung zum Zeitpunkt E18,5 ergab keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Ausdehnung der Kortikalen Platte (**D**), Ventrikularzone (**E**) bzw. Kortikalen Wand (**F**). Daten zeigen MW \pm SEM; Daten waren nicht normalverteilt, woraufhin ein Mann-Whitney-Test durchgeführt wurde. (* $p < 0,01$; n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5); drei Mäuse/Genotyp (E18,5). Die MW, SD, SEM und n -Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

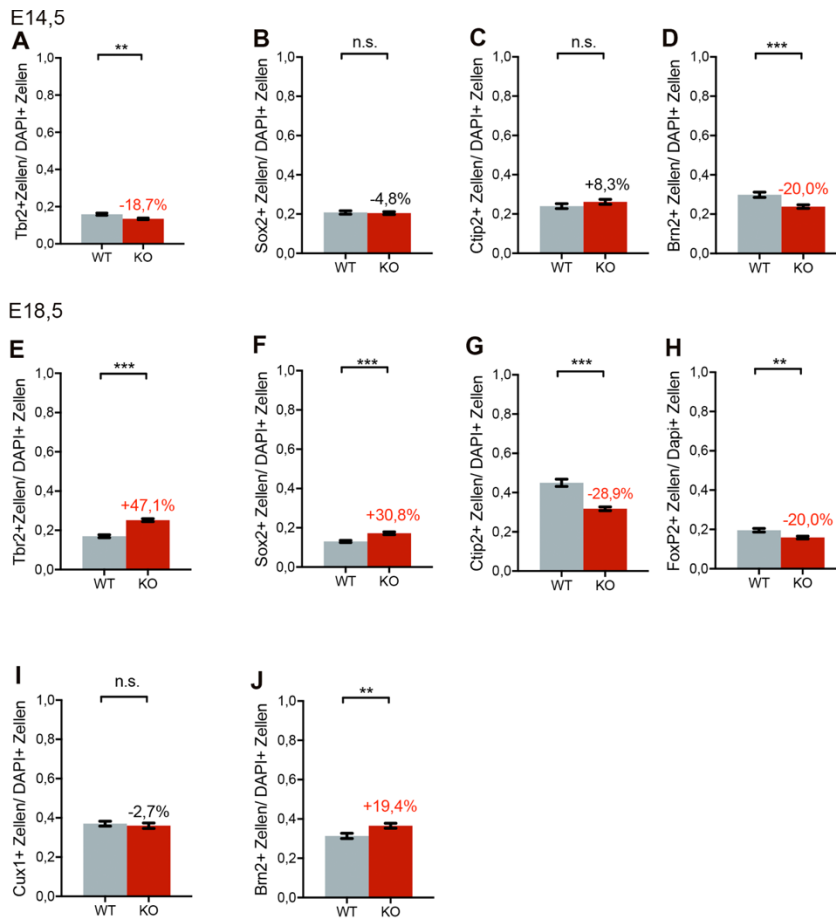


Abb. 21: Angefärbte Zellen pro Gesamtzellzahl. Visualisiert ist die statistische Auswertung der von den verschiedenen Vorläuferzell- und Schichtenmarkern angeführten Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, zum Zeitpunkt E14,5 (A-D) sowie zum Tag E18,5 (E-J). Daten zeigen MW ± SEM; Student's t-Test bei normalverteilten Daten (A, D, E, F, G, H, I, J) oder Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Daten (B, C) (**p<0,01; ***p<0,001; n.s.: nicht signifikant); vier Mäuse/Genotyp (E14,5; E18,5). Die MW, SD, SEM und n- Werte sind in Tabelle 5 angehängt.

11.1.2 Tabellen

Tabelle 4: Vergleich von Marker+ Zellen mit der Gesamtzelldichte.

E14,5	WT	KO
DAPI+ Zelldichte/ 1000 µm ²	19,9	20,7
Addition der Zelldichte aller verwendeten Marker/ 1000 µm ²	Tbr2: 2,9; Sox2: 3,8; Ctip2: 4,6; Brn2: 6,0 = 17,3	Tbr2: 2,4; Sox2: 3,7; Ctip2: 5,7; Brn2: 5,0 = 16,8
Differenz	-2,6 Zellen/ 1000 µm ²	-3,9 Zellen/ 1000 µm ²
E18,5	WT	KO
DAPI+ Zelldichte/ 1000 µm ²	11,5	11,7
Addition der Zelldichte aller verwendeten Schichtenmarker/ 1000 µm ²	Tbr2: 1,8; Sox2: 1,4; Ctip2: 5,2; FoxP2: 2,4; Cux1: 4,1; Brn2: 3,5 = 18,4	Tbr2: 2,8; Sox2: 1,9; Ctip2: 4,0; FoxP2: 2,0; Cux1: 4,1; Brn2: 4,2 = 19,0
Differenz	zusätzliche 6,9 Zellen/ 1000 µm ²	zusätzliche 7,3 Zellen/ 1000 µm ²

11.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die pränatale murine Gehirnentwicklung.	Seite 11
Abb. 2:	Der Aufbau einer pilzförmigen Postsynapse.	Seite 14
Abb. 3:	Die morphologische Klassifizierung dendritischer Dornen.	Seite 15
Abb. 4:	Die Struktur der Syndapine.	Seite 20
Abb. 5:	Übersichtsaufnahme eines Nissl-gefärbten wildtypischen Gehirns.	Seite 36
Abb. 6:	Golgi MIP mit korrespondierender Dendriten- und Dornfortsatzrekonstruktion.	Seite 39
Abb. 7:	Syndapin III KO Mäuse zeigten eine signifikante Reduzierung der Dichte der dendritischen Dornfortsätze von Pyramidenzellen in den Kortexschichten II/III und V.	Seite 40
Abb. 8:	Syndapin III KO Mäuse trugen verglichen mit WT anteilig mehr unreife dendritische Dornfortsätze auf ihren kortikalen Dendriten der Schichten II/III und V.	Seite 41
Abb. 9:	Syndapin III Defizienz führte zu einer veränderten Konstitution der dendritischen Dornenköpfe in kortikalen Pyramidenzellen der Schichten II/III und V.	Seite 44
Abb. 10:	Syndapin III KO Mäuse wiesen im Vergleich mit WT Veränderungen in der Länge dendritischer Dornfortsätze in Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen des Kortex auf.	Seite 46
Abb. 11:	Nissl-Färbungen zur Analyse der Organisation des embryonalen Kortex.	Seite 48
Abb. 12:	Immunfluoreszenz Analyse der Gesamtzellichte unter Verwendung von DAPI.	Seite 50
Abb. 13:	Immunhistochemische Untersuchungen von Pyramidenzellen des Neokortex mit den Markern Tbr2 und Sox2 zu embryonalen Zeitpunkten.	Seite 52
Abb. 14:	Immunhistochemische Analyse Ctip2+ und FoxP2+ neokortikaler Neurone im embryonalen WT und Syndapin III KO.	Seite 55
Abb. 15:	Analyse immunfluoreszenter Cux1+ kortikaler Neurone im Vergleich der Genotypen.	Seite 57
Abb. 16:	Immunhistochemische Untersuchung Brn2+ Nervenzellen	Seite 58

im embryonalen WT und Syndapin III KO.

Abb. 17:	Vergleich der Dichte kortikaler dendritischer Dornen von Syndapin I und Syndapin III KO Mäusen.	Seite 61
Abb. 18:	Lebenszeitkurve der Anzahl kortikaler dendritischer Dornen.	Seite 66
Abb. 19:	Die Dimensionen des sich entwickelnden Neokortex.	Seite 71
Abb. 20:	Absolute Ausdehnung der Kortikalen Platte, Ventrikularzone und Kortikalen Wand.	Seite 103
Abb. 21:	Angefärbte Zellen pro Gesamtzellzahl.	Seite 104

11.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete primäre Antikörper.	Seite 29
Tabelle 2:	Verwendete sekundäre Antikörper.	Seite 29
Tabelle 3:	Einteilung dendritischer Dornfortsätze in Morphologiegruppen.	Seite 33
Tabelle 4:	Vergleich von Marker+ Zellen mit der Gesamtzell- dichte.	Seite 104
Tabelle 5:	MW, SD, SEM, <i>n</i> -Werte.	Seite 107- 114

11.4 Statistische Daten

Tabelle 5: MW, SD, SEM, *n*-Werte.

Zu Abb. 7: Syndapin III KO Mäuse zeigten eine signifikante Reduzierung der Dichte der dendritischen Dornfortsätze von Pyramidenzellen in den Kortexschichten II/III und V.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
Dornendichte [pro 10 µm Dendrit]					
A Dornen Gesamt Schicht II/III	WT	14,78	4,96	0,74	45 ¹
	KO	9,44	2,93	0,42	48 ¹
B Dornen Gesamt Schicht V	WT	13,04	3,93	0,58	46 ¹
	KO	7,71	3,44	0,50	47 ¹
C Stummelförmige Dornen Schicht II/III	WT	3,66	2,56	0,38	45 ¹
	KO	1,09	1,08	0,16	48 ¹
D Stummelförmige Dornen Schicht V	WT	3,64	2,49	0,37	46 ¹
	KO	1,52	1,67	0,24	47 ¹
E Dünne Dornen Schicht II/III	WT	2,13	1,04	0,16	45 ¹
	KO	1,45	0,62	0,09	48 ¹
F Dünne Dornen Schicht V	WT	1,59	0,78	0,12	46 ¹
	KO	1,20	0,46	0,07	47 ¹
G Pilzförmige Dornen Schicht II/III	WT	6,42	3,29	0,49	45 ¹
	KO	4,12	2,04	0,29	48 ¹
H Pilzförmige Dornen Schicht V	WT	5,32	2,57	0,38	46 ¹
	KO	3,63	1,68	0,25	47 ¹
I Filopodienähnliche Dornen Schicht II/III	WT	1,64	1,04	0,16	45 ¹
	KO	1,30	0,76	0,11	48 ¹
J Filopodienähnliche Dornen Schicht V	WT	1,50	0,81	0,12	46 ¹
	KO	1,37	0,85	0,12	47 ¹
Zu Abb. 8: Syndapin III KO Mäuse trugen verglichen mit WT anteilig	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

mehr unreife dendritische Dornfortsätze auf ihren kortikalen Dendriten der Schichten II/III und V.						
Relative Häufigkeit						
C Stummelförmige Dornen Schicht II/III	WT	23,86	13,61	2,03	45 ¹	
	KO	12,61	8,62	1,25	48 ¹	
D Stummelförmige Dornen Schicht V	WT	27,64	15,22	2,24	46 ¹	
	KO	16,61	11,41	1,67	47 ¹	
E Dünne Dornen Schicht II/III	WT	16,85	7,53	1,12	45 ¹	
	KO	19,42	7,40	1,07	48 ¹	
F Dünne Dornen Schicht V	WT	14,32	7,48	1,10	46 ¹	
	KO	17,29	7,06	1,03	47 ¹	
G Pilzförmige Dornen Schicht II/III	WT	46,44	10,62	1,58	45 ¹	
	KO	51,55	11,31	1,63	48 ¹	
H Pilzförmige Dornen Schicht V	WT	44,72	9,94	1,47	46 ¹	
	KO	47,21	7,58	1,11	47 ¹	
I Filopodienähnliche Dornen Schicht II/III	WT	12,84	8,23	1,23	45 ¹	
	KO	16,43	7,63	1,10	48 ¹	
J Filopodienähnliche Dornen Schicht V	WT	13,33	7,37	1,09	46 ¹	
	KO	16,43	7,63	1,10	48 ¹	
J Filopodienähnliche Dornen Schicht V	WT	13,33	7,37	1,09	46 ¹	
	KO	18,89	9,52	1,39	47 ¹	
Zu Abb. 9: Syndapin III Defizienz führte zu einer veränderten Konstitution der dendritischen Dornenköpfe in kortikalen Pyramidenzellen der Schichten II/III und V.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n	
Kopfweite [µm]						
A Kopfhaltige Dornen Schicht II/III	WT	0,639	0,221	0,003	5878 ²	

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

	KO	0,618	0,234	0,004	2939 ²
B Kopfhaltige Dornen Schicht V	WT	0,659	0,233	0,003	4978 ²
	KO	0,650	0,228	0,004	3092 ²
C Stummelförmige Dornen Schicht II/III	WT	0,612	0,204	0,005	1801 ²
	KO	0,634	0,234	0,011	448 ²
D Stummelförmige Dornen Schicht V	WT	0,620	0,215	0,005	1767 ²
	KO	0,622	0,212	0,008	764 ²
E Dünne Dornen Schicht II/III	WT	0,414	0,053	0,002	1006 ²
	KO	0,398	0,084	0,003	665 ²
F Dünne Dornen Schicht V	WT	0,410	0,055	0,002	719 ²
	KO	0,410	0,056	0,002	571 ²
G Pilzförmige Dornen Schicht II/III	WT	0,729	0,207	0,004	3071 ²
	KO	0,695	0,220	0,005	1826 ²
H Pilzförmige Dornen Schicht V	WT	0,758	0,216	0,004	2492 ²
	KO	0,741	0,208	0,005	1757 ²
Kopfvolumen [μm^3]					
I Kopfhaltige Dornen Schicht II/III	WT	0,186	0,346	0,005	5878 ²
	KO	0,163	0,165	0,003	2939 ²
J Kopfhaltige Dornen Schicht V	WT	0,162	0,212	0,003	4978 ²
	KO	0,162	0,222	0,004	3092 ²
K Stummelförmige Dornen Schicht II/III	WT	0,084	0,090	0,002	1801 ²
	KO	0,090	0,093	0,004	448 ²
L Stummelförmige Dornen Schicht V	WT	0,088	0,090	0,002	1767 ²
	KO	0,085	0,081	0,003	764 ²
M Dünne Dornen Schicht II/III	WT	0,088	0,241	0,008	1006 ²
	KO	0,060	0,037	0,001	665 ²
N Dünne Dornen Schicht V	WT	0,053	0,024	0,001	719 ²

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

	KO	0,053	0,024	0,001	571 ²
O Pilzförmige Dornen Schicht II/III	WT	0,277	0,433	0,008	3071 ²
	KO	0,218	0,182	0,004	1826 ²
P Pilzförmige Dornen Schicht V	WT	0,246	0,264	0,005	2492 ²
	KO	0,231	0,270	0,006	1757 ²
Zu Abb. 10: Syndapin III KO Mäuse wiesen im Vergleich mit WT Veränderungen in der Länge dendritischer Dornfortsätze in Schicht II/III- und V-Pyramidenzellen des Kortex auf.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
Dornenlänge [µm]					
A Dornen Gesamt Schicht II/III	WT	1,41	1,00	0,01	6648 ²
	KO	1,73	1,00	0,02	3523 ²
B Dornen Gesamt Schicht V	WT	1,35	0,97	0,01	5644 ²
	KO	1,60	1,05	0,02	3739 ²
C Stummelförmige Dornen Schicht II/III	WT	0,43	0,19	0,01	1801 ²
	KO	0,51	0,18	0,01	448 ²
D Stummelförmige Dornen Schicht V	WT	0,45	0,19	0,01	1767 ²
	KO	0,43	0,19	0,01	764 ²
E Dünne Dornen Schicht II/III	WT	1,67	0,90	0,03	1006 ²
	KO	1,87	0,95	0,04	665 ²
F Dünne Dornen Schicht V	WT	1,74	0,86	0,03	719 ²
	KO	1,80	0,85	0,04	571 ²
G Pilzförmige Dornen Schicht II/III	WT	1,81	0,94	0,02	3071 ²
	KO	1,91	0,93	0,02	1826 ²
H Pilzförmige Dornen Schicht V	WT	1,76	0,93	0,02	2492 ²
	KO	1,91	1,00	0,02	1757 ²
I Filopodienähnliche Dornen Schicht II/III	WT	1,77	0,98	0,04	770 ²
	KO	1,92	0,95	0,04	584 ²
J Filopodienähnliche Dornen Schicht V	WT	1,76	0,86	0,03	666 ²

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

	KO	1,97	0,97	0,04	647 ²
Zu Abb. 11: Nissl-Färbungen zur Analyse der Organisation des embryonalen Kortex.	Kon- di- tion	MW	SD	SEM	n
E14,5					
E Kortikale Platte/Kortikale Wand	WT	0,14	0,45	0,01	75 ⁴
	KO	0,16	0,51	0,01	72 ⁴
F Ventrikularzone/Kortikale Wand	WT	0,38	0,10	0,01	75 ⁴
	KO	0,41	0,10	0,01	72 ⁴
G Kortikale Wand [μm]	WT	161,50	51,62	5,96	75 ⁴
	KO	168,10	58,16	6,86	72 ⁴
E18,5					
H Kortikale Platte/Kortikale Wand	WT	0,43	0,14	0,02	54 ⁴
	KO	0,37	0,11	0,02	52 ⁴
I Ventrikularzone/Kortikale Wand	WT	0,19	0,08	0,01	54 ⁴
	KO	0,16	0,07	0,01	52 ⁴
J Kortikale Wand [μm]	WT	444,20	174,00	23,68	54 ⁴
	KO	462,70	103,30	14,32	52 ⁴
Zu Abb. 12: Immunfluoreszenz Analyse der Gesamtzellichte unter Verwendung von DAPI.	Kon- di- tion	MW	SD	SEM	n
A E14,5 DAPI+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	19,94	4,40	0,33	174 ⁴
	KO	20,72	4,27	0,32	176 ⁴
B E18,5 DAPI+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	11,50	2,52	0,19	174 ⁴
	KO	11,74	1,93	0,15	174 ⁴
Zu Abb. 13: Immunhistochemische Untersuchungen von Pyramidenzellen des Neokortex mit den Markern Tbr2 und Sox2 zu embryonalen Zeitpunkten.	Kon- di- tion	MW	SD	SEM	n

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

E E14,5 Tbr2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	2,85	0,63	0,09	54 ⁴
	KO	2,43	0,64	0,08	59 ⁴
F E18,5 Tbr2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	1,83	0,60	0,08	57 ⁴
	KO	2,79	0,68	0,09	57 ⁴
G E14,5 Sox2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	3,84	1,06	0,15	53 ⁴
	KO	3,69	0,90	0,12	59 ⁴
H E18,5 Sox2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	1,40	0,36	0,05	57 ⁴
	KO	1,93	0,66	0,09	57 ⁴
Zu Abb. 14: Immunhistochemische Analyse Ctip2+ und FoxP2+ neokortikaler Neurone im embryonalen WT und Syndapin III KO.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
G E14,5 Ctip2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	4,60	1,35	0,17	60 ⁴
	KO	5,74	1,89	0,24	60 ⁴
H E18,5 Ctip2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	5,22	1,06	0,14	57 ⁴
	KO	3,97	0,87	0,11	60 ⁴
I E18,5 FoxP2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	2,39	1,02	0,14	57 ⁴
	KO	2,01	0,75	0,10	59 ⁴
Zu Abb. 15: Analyse immunfluoreszenter Cux1+ kortikaler Neurone im Vergleich der Genotypen.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
C E18,5 Cux1+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	4,12	1,22	0,16	60 ⁴
	KO	4,13	1,20	0,16	56 ⁴
Zu Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung Brn2+ Nervenzellen im embryonalen WT und Syndapin III KO.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
E E14,5 Brn2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	6,00	2,00	0,26	57 ⁴
	KO	5,01	1,38	0,18	57 ⁴

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

F E18,5 Brn2+ Zellen/ 1000 μm^2	WT	3,46	1,27	0,16	60 ⁴
	KO	4,20	1,09	0,15	56 ⁴
Zu Abb. 20: Absolute Ausdehnung der Kortikalen Platte, Ventrikularzone und Kortikalen Wand.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
E14,5					
A Kortikale Platte [μm]	WT	23,03	13,28	1,53	75 ⁴
	KO	25,89	12,39	1,45	73 ⁴
B Ventrikularzone [μm]	WT	58,82	13,75	1,59	75 ⁴
	KO	63,94	21,84	2,56	73 ⁴
C bei Abb. 11 als G aufgeführt					
B E18,5					
D Kortikale Platte [μm]	WT	195,20	106,80	14,54	54 ⁴
	KO	176,30	72,15	10,01	52 ⁴
E Ventrikularzone [μm]	WT	83,53	44,40	6,04	54 ⁴
	KO	80,38	68,01	9,43	52 ⁴
F bei Abb. 11 als J aufgeführt					
Zu Abb. 21: Gefärbte Zellen pro Gesamtzellzahl.	Kon- diti- on	MW	SD	SEM	n
E14,5					
A Tbr2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,16	0,05	0,01	54 ⁴
	KO	0,13	0,03	0,01	59 ⁴
B Sox2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,21	0,07	0,01	53 ⁴

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

	KO	0,20	0,05	0,01	59 ⁴
C Ctip2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,24	0,10	0,01	60 ⁴
	KO	0,26	0,10	0,01	60 ⁴
D Brn2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,30	0,10	0,01	57 ⁴
	KO	0,24	0,07	0,01	57 ⁴
E18,5					
E Tbr2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,17	0,06	0,01	57 ⁴
	KO	0,25	0,06	0,01	57 ⁴
F Sox2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,13	0,04	0,01	57 ⁴
	KO	0,17	0,05	0,01	57 ⁴
G Ctip2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,45	0,14	0,02	57 ⁴
	KO	0,32	0,07	0,01	60 ⁴
H FoxP2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,20	0,07	0,01	57 ⁴
	KO	0,16	0,05	0,01	59 ⁴
I Cux1+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,37	0,10	0,01	60 ⁴
	KO	0,36	0,11	0,01	56 ⁴
J Brn2+ Zellen/ DAPI+ Zellen	WT	0,31	0,10	0,01	60 ⁴
	KO	0,37	0,10	0,01	56 ⁴

¹ Dendritenabschnitte; ² Dornfortsätze; ³ Tiere; ⁴ Kortexabschnitte.

11.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen und Instituten bzw. Institutionen entgegenbringen, ohne deren Unterstützung mir die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt zunächst *Frau Prof. Dr. Britta Qualmann*, Leiterin des Instituts für Biochemie I des UKJ. Sie hat es mir ermöglicht, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen und mit der forschungsorientierten Neigungslinie meines Medizinstudiums zu verbinden. Mit ihrer Unterstützung sowie den Korrekturen und Anmerkungen an meinen Entwürfen hat Frau Prof. Qualmann mir einen kritischen Zugang zu meinem Dissertationsthema eröffnet. Den bereichernden konstruktiven Austausch habe ich stets als Motivation empfunden und die fortwährende zeitnahe Bereitschaft für Gesprächstermine nie als selbstverständlich angesehen. Ferner danke ich ausdrücklich *Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Kessels* für seine ständige und mitunter auch kurzfristige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, welche ich stets sehr zu schätzen gewusst habe. Ich möchte auch allen weiteren Gutachtern danken, dass sie ihre fachliche Qualifikation und wertvolle Zeit zum Bewerten meiner Arbeit zur Verfügung stellen.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit mit einem Promotionsstipendium und somit die Ermöglichung einer fokussierten, fundierten Datenerhebung im Rahmen eines Urlaubssemesters bin ich insbesondere dem *Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung* des UKJ und allen seinen Mitgliedern ausgesprochen verbunden.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie I des UKJ, vor allem *Christin Scharf, Birgit Schade und Michaela Öhler*, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle und fachkundige Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. *Christin Scharf* möchte ich zusätzlich für die Durchführung der Genotypisierungen danken, *Sarah Krüger* für die Bereitstellung ihrer Daten. *Jule Müller* und *Nicole Koch* danke ich überdies für die Hilfestellung bei allen methodischen und technischen Fragen, die sich während der Durchführung meiner Arbeit ergeben haben. Vielen Dank an *Elisa Engelmann* für die Anfertigung der Golgi-Aufnahme.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich ferner bei meinen Eltern, *Olaf und Annette Hosse* für die uneingeschränkte, liebevolle sowie vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums und während der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Meiner gesamten Familie und somit auch meiner Schwester *Stefanie* und mei-

nen Großeltern möchte ich diese Arbeit widmen.

11.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Britta Qualmann, PD Dr. Michael Kessels, Christin Scharf, Birgit Schade, Michaela Öhler, Sarah Krüger, Jule Müller, Nicole Koch, Elisa Engelmann, meine Familie,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule nicht als Dissertation eingereicht habe.

Hamburg, den 25. Juni 2018

Clarissa Hosse