

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Morphologie
Institut für Anatomie I
Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Die Konsequenzen der zeitspezifischen Deletion von
Neurologin 2 für die synaptische Übertragung, Plastizität und
neuronale Exzitabilität im Gyrus Dentatus von adulten Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Franziska Frank

aus Zweibrücken

Frankfurt am Main, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Morphologie
Institut für Anatomie I
Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Die Konsequenzen der zeitspezifischen Deletion von
Neurologin 2 für die synaptische Übertragung, Plastizität und
neuronale Exzitabilität im Gyrus Dentatus von adulten Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Franziska Frank

aus Zweibrücken

Frankfurt am Main, 2021

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Peter Jedlicka
Korreferent/in: Prof Dr. Dr. rer. nat. Abdelhaq Rami
Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2021

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
SUMMARY	12
1 EINLEITUNG	14
1.1 Hippocampus	14
1.1.1 Funktion des Hippocampus	14
1.1.2 Anatomie des Hippocampus	16
1.1.3 Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus	18
1.2 Übertragung an der Synapse und Plastizitätsmechanismen	20
1.2.1 Grundlagen der synaptischen Signalübertragung	20
1.2.2 Kurzzeitplastizität	21
1.2.3 Langzeitplastizität	22
1.3 Neuroligin 2	24
1.3.1 Klinische Relevanz von Neuroligin 2	24
1.3.2 Funktion von Neuroligin 2 an der Synapse	25
1.3.3 Rolle von Neuroligin 2 im Gyrus Dentatus	27
1.4 Fragestellung der Doktorarbeit	29
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Material	31
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	31
2.1.2 Puffer und Gele	32
2.1.3 Kits	33
2.1.4 Antikörper	33
2.1.5 Geräte und Plastikware	33
2.1.6 Mikrochirurgische Instrumente	35
2.1.7 Software	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Tiere	36
2.2.2 Beschreibung der konditionalen Nlgn2-Knockout Mauslinie	36
2.2.3 Applikation von Tamoxifen per Schlundsonde	39
2.2.4 Narkoseeinleitung	41
2.2.5 Stereotaktische Chirurgie	42
2.2.6 Ableitung der Feldpotentiale	44
2.2.7 Analyse der elektrophysiologischen Daten	46
2.2.8 Proteinanalyse von Neuroligin 2	47
2.2.8.1 Entnahme des Hippocampus	47
2.2.8.2 Probenvorbereitung und Proteinquantifizierung	47
2.2.8.3 Proteinvorbereitung	48

2.2.8.4	SDS-PAGE	48
2.2.8.5	Western-Blotting	49
2.2.8.6	Analyse der Western-Blotting Daten	50
2.2.9	Statistik	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Signifikante Reduktion von Nlgn2 auf Genom- und Proteinebene	52
3.2	Keine signifikant veränderte Erregbarkeit der Körnerzellen in adulten Nlgn2 cKO Mäusen	54
3.2.1	Input / Output – Messungen des Populationsspikes	54
3.2.2	Multiple Spike Discharges	56
3.3	Synaptische Transmission im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO Mäuse	57
3.4	Plastizität im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO Mäusen	59
3.4.1	Prüfung auf Kurzzeitplastizität	59
3.4.2	Prüfung auf Langzeitplastizität	60
3.5	Netzwerkinhibition im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO Mäusen	62
4	DISKUSSION	67
4.1	Reduktion von Nlgn2 auf Genom- und Proteinebene	67
4.2	Elektrophysiologische Experimente im Gyrus Dentatus von Nlgn2 cKO Mäusen	70
4.2.1	Exzitabilität der Körnerzellen	70
4.2.2	Synaptische Transmission	71
4.2.3	Netzwerkinhibition	73
4.2.4	Kurz- und Langzeitplastizität	74
4.2.5	Limitationen der elektrophysiologischen Untersuchungsmethode	76
4.3	Bedeutung von Nlgn2 für die Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus	78
4.4	Ausblick	81
5	LITERATURVERZEICHNIS	84
6	ANHANG	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lage des Hippocampus im menschlichen Gehirn ⁴	16
Abbildung 1.2 modifiziert nach ¹³ : Anatomischer Aufbau der Hippocampusformation	18
Abbildung 1.3 modifiziert nach ³ : Vereinfachte Darstellung des direkten und trisynaptischen Erregungsweges im Hippocampus.....	20
Abbildung 1.4 modifiziert nach ³ : Signalübertragung an der chemischen Synapse	21
Abbildung 1.5 modifiziert nach ⁵¹ : Interaktionspartner von Neuroligin 2 an der inhibitorischen postsynaptischen Membran	26
Abbildung 1.6: Erhöhte Erregbarkeit von Körnerzellen in Nlgn2 Knockout Mäusen ⁴⁹	28
Abbildung 1.7: Nlgn2 KO Mäuse zeigen eine Reduktion der somatischen GABA _A R-Cluster (γ 2-Untereinheit) und des postsynaptischen Gephyrin ⁴⁹	29
Abbildung 2.1 nach ⁵⁷ : Schematische Darstellung der genetischen Basis des konditionalen Nlgn2 Knockouts.....	37
Abbildung 2.2 nach ⁵⁷ : Vergleich der konditionalen Nlgn2 KO Mäuse mit dem Wildtyp	38
Abbildung 2.3 modifiziert nach ⁶² : Tamoxifen induzierter konditionaler Knockout	40
Abbildung 2.4 modifiziert nach ⁶⁶ : Schematische Darstellung der Elektrodenposition	44
Abbildung 3.1: Genotypisierung der Schwanzspitzen zeigt eine signifikante Reduktion von Nlgn2 nach Tamoxifen Behandlung in Cre-homozygoten Tieren	53
Abbildung 3.2: Reduktion der Proteinkonzentration von Nlgn2 in Hippocampi von konditionalen KO Mäusen	54
Abbildung 3.3: Input/Output-Funktion des Populationsspikes zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 1)..	55
Abbildung 3.4: Input/Output-Funktion des Populationsspikes zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 2)..	56

Abbildung 3.5: Epilepsieähnliche Entladungen im Gyrus Dentatus konditionaler Nlgn2 Knockout Mäuse bleiben unverändert	57
Abbildung 3.6: Input/Output-Funktion der fEPSP slope zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 1)	58
Abbildung 3.7: Input/Output-Funktion der fEPSP slope zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 2)	58
Abbildung 3.8: Doppelpuls-Fazilitierungsmessungen des Gyrus Dentatus zeigen sich unbeeinträchtigt in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen.....	60
Abbildung 3.9: Die synaptische Langzeitplastizität der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse zeigt sich unbeeinträchtigt in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen	61
Abbildung 3.10 modifiziert nach ⁴⁹ : Mechanismen der Exzitation und Inhibition im Netzwerk des Gyrus Dentatus	63
Abbildung 3.11: GABAerge Netzwerkinhibition zeigt sich unbeeinträchtigt durch den konditionalen Knockout von Nlgn2 bei maximaler Stimulation	64
Abbildung 3.12: GABAerge Netzwerkinhibition zeigt sich unbeeinträchtigt durch den konditionalen Knockout von Nlgn2 bei minimaler Stimulation.....	65
Abbildung 3.13: Keine signifikante Änderung der PPI-Dauer in konditionalen Nlgn2 KO Tieren	66
Abbildung 4.1 modifiziert nach ⁵⁷ : Proteinreduktion von Nlgn2 in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen in Amygdala und Hippocampus	70
Abbildung 4.2 nach ⁴⁹ : Beeinträchtigung der GABAergen Netzwerkinhibition des Gyrus Dentatus in Nlgn2 KO Mäusen	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen	31
Tabelle 2: Puffer und Gele	32
Tabelle 3: Kits	33
Tabelle 4: Antikörper	33
Tabelle 5: Geräte und Plastikware	33
Tabelle 6: Mikrochirurgische Instrumente	35
Tabelle 7: Software	35

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionische Säure
APS	Ammoniumpersulfat
CA	Cornu Ammonis
CAM	Cell Adhesion Protein
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serin Protein Kinase
Cre	Cre-Rekombinase
Da	Dalton
EPSP	Excitatorisches Postsynaptisches Potential
ER	Estrogenrezeptor
fEPSP	field Excitatorisches Postsynaptisches Potential
Fl	Floxed
FLP	Rekombinase Flippase
FRT	FLP-Rekombinase Target
G-5	5%ige Glucoselösung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H.M.	Henry Gustav Molaison
Hom	Homozygot
IPI	Interpulsintervall
IPSP	Inhibitorisches Postsynaptisches Potential
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LD-50	Mittlere Letale Dosis
LoxP	Locus of X-over P1
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
mIPSCs	Miniature Inhibitorisches Postsynaptisches Currents

Munc18	Mammalian Uncoordinated-18
NaCl	Natriumchlorid
Nlgn	Neurologin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	probabilitas
p.B.	Post Bregma
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	Post Synaptic Density Protein (PSD95) Drosophila Disc Large Tumor Suppressor (Dlg1) Zonula Occludens-1 Protein (zo-1)
PPDI	Paired-Pulse Disinhibition
PPF	Paired-Pulse Facilitation
PPI	Paired-Pulse Inhibition
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Umdrehungen pro Minute
S-SCAM	Synaptic Scaffolding Molecule
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean
T	Tamoxifen
TBS	Theta Burst Stimulation
TBS-Puffer	Tris-buffered Saline
TBS-T-Puffer	Tris-buffered Saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
V	Vehikel
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Eines der übergeordneten Ziele neurowissenschaftlicher Grundlagenforschung ist es, die Pathomechanismen neuropsychiatrischer Erkrankungsbilder besser zu verstehen. Als Erklärungsmodell für einige dieser Erkrankungen dient unter anderem ein gestörtes Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition im Gehirn. Synaptische Strukturproteine sind wichtige Modulatoren dieses Verhältnisses. Für eine unbeeinträchtigte inhibitorische synaptische Transmission spielt das postsynaptische Zelladhäsionsprotein Neuroligin 2 eine maßgebliche Rolle, um das Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition aufrechtzuerhalten. Neuroligin 2 ist an der inhibitorischen Synapse lokalisiert und beeinflusst die Entwicklung, Reifung und Funktion dieser Synapse. Die klinische Relevanz von Neuroligin 2 wurde bereits bei zahlreichen Erkrankungsbildern wie Schizophrenie, Depression oder Epilepsie im Rahmen von Studien nachgewiesen. Um das Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition *in vivo* sowie Mechanismen der synaptischen Übertragung und Plastizität zu untersuchen, hat sich die Ableitung von Feldpotentialen im Gyrus Dentatus des Hippocampus etabliert. Im Neuroligin 2 Knockout Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine pränatale Deletion dieses Proteins eine stark erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen und eine verminderte GABAerge Netzwerkinhibition im Gyrus Dentatus *in vivo* zur Folge hat.

Unklar blieb bisher, ob diese durch den konventionellen Neuroligin 2 Knockout (pränatal) hervorgerufenen Netzwerkveränderungen alleine auf das Fehlen dieses Proteins zurückzuführen sind oder durch eine zusätzliche Beeinträchtigung der Hirnentwicklung hervorgerufen werden. Ziel dieser Dissertation ist es deshalb, die Rolle von Neuroligin 2 im Gyrus Dentatus durch einen induzierten Knockout in adulten Mäusen (postnatal) unabhängig von einem möglichen Entwicklungseffekt zu klären.

Dazu wurde im ersten methodischen Schritt dieser Dissertation durch orale Tamoxifen-Gabe eine zeitspezifische konditionale Eliminierung von Neuroligin 2 in genetisch modifizierten, adulten Mäusen erzielt. Im Anschluss an diese konditionale Eliminierung wurde die synaptische Transmission, Plastizität sowie

neuronale Erregbarkeit von Körnerzellen im Gyrus Dentatus mittels elektrophysiologischer Experimente untersucht. Hierzu wurde zunächst der Tractus Perforans und die Körnerzellschicht durch stereotaktische Chirurgie in anästhesierten Mäusen lokalisiert. Anschließend wurde eine Stimulation des Tractus Perforans sowie eine Ableitung von Feldpotentialen im Gyrus Dentatus durchgeführt. Um die Erregbarkeit der Körnerzellen, die synaptische Transmission, Kurz- und Langzeitplastizität sowie Netzwerkinhibition im Gyrus Dentatus zu analysieren, wurden unterschiedliche Stimulationsprotokolle verwendet. Im Anschluss an die elektrophysiologischen Experimente wurden die Hippocampi beidseitig entnommen, konserviert und später einer Proteinquantifizierung von Neuroligin 2 mittels Western-Blotting unterzogen.

Die Ergebnisse zeigten ein signifikant verringertes Proteinlevel von Neuroligin 2 auf 41,07% im Hippocampus von konditionalen Neuroligin 2 Knockout Mäusen. Unter dieser Reduktion von Neuroligin 2 in adulten Mäusen war die *in vivo* Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus sowie GABAerge Netzwerkinhibition weitgehend unbeeinträchtigt und die signifikanten Beobachtungen des konventionellen Knockout Modells ließen sich nicht reproduzieren. Aufgrund der unvollständigen Proteinreduktion lässt sich jedoch nicht abschließend beurteilen, ob die Restmenge den elektrophysiologischen Effekt kompensiert oder ob die im konventionellen Neuroligin 2 Knockout Modell beobachteten Effekte auf eine ausschließliche Rolle von Neuroligin 2 in der Hirnentwicklungsperiode zurückzuführen sind. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigten allerdings, dass die postnatale Deletion von Neuroligin 2 in anderen Hirnregionen zu einer verminderten Netzwerkinhibition führt.

Neben der hier verwendeten *in vivo* Methodik ist eine Ergänzung von Untersuchungen in nicht-anästhesierten Tieren sowie Messungen einzelner Zellen durch whole-cell patch-clamp Untersuchungen *in vitro* oder *in vivo* zu erwägen. Es sollte dabei auf eine konditionale Proteineliminierung geachtet werden, damit mögliche Kompensationsmechanismen weitgehend ausgeschlossen werden können. Eine weiterführende immunhistochemische Bildgebung der Hippocampuspräparate, wie sie im konventionellen Knockout durchgeführt wurde, könnte sich hierbei ebenso als aufschlussreich für die Funktion von Neuroligin 2 im Hippocampus des adulten Tieres erweisen.

Summary

One of the overarching goals of basic research in neuroscience is to better understand the pathomechanisms of neuropsychiatric disorders. A disturbed relationship between excitation and inhibition in the brain serves as an explanatory model for some of these disorders. Synaptic structural proteins are important modulators of this relationship. The postsynaptic cell adhesion protein neuroligin 2 plays a crucial role in maintaining the balance between excitation and inhibition for unimpaired inhibitory synaptic transmission. Neuroligin 2 is localized at inhibitory synapses and influences their development, maturation and function. The clinical relevance of neuroligin 2 has already been demonstrated in numerous diseases such as schizophrenia, depression or epilepsy. The recording of field potentials in the dentate gyrus of the hippocampus *in vivo* is a well-established method for the investigation of the relationship between excitation and inhibition as well as mechanisms of synaptic transmission and plasticity. In the neuroligin 2 knockout mouse model, it has already been shown *in vivo* that prenatal deletion of this protein results in increased excitability of granule cells and decreased GABAergic network inhibition in the dentate gyrus.

It has remained unclear whether these network changes induced by conventional neuroligin 2 knockout (prenatal) are due to the absence of this protein alone or are caused by an additional disruption of brain development. Therefore, the aim of this dissertation is to clarify the role of neuroligin 2 in the dentate gyrus using an induced knockout in adult mice (postnatal) to rule out a possible developmental effect.

In the first step of this dissertation, a time-specific conditional deletion of neuroligin 2 was achieved by oral tamoxifen administration in genetically modified adult mice. Following this conditional knockout, synaptic transmission, plasticity as well as neuronal excitability of granule cells in the dentate gyrus was investigated by means of electrophysiological experiments. For this purpose, the perforant path and the granule cell layer were initially localized by stereotactic surgery in anesthetized mice. Subsequently, stimulation of the perforant path

and measurements of field potentials in the dentate gyrus were performed. Different stimulation protocols were used to analyze granule cell excitability, synaptic transmission, short- and long-term plasticity and network inhibition in the dentate gyrus. Following the electrophysiological experiments, the hippocampi were preserved bilaterally and later on used for protein quantification of neuroligin 2 by Western blotting.

The results showed a significantly decreased protein level of neuroligin 2 to 41.07% in the hippocampus of conditional neuroligin 2 knockout mice. Under this reduction of neuroligin 2 in adult mice, the *in vivo* excitability of dentate gyrus granule cells and GABAergic network inhibition were mostly unaffected, and the significant observations of the conventional knockout model could not be reproduced. Because of the incomplete protein reduction, it cannot be conclusively assessed whether the residual amount compensates for the electrophysiological effect or whether the effects observed in the conventional neuroligin 2 knockout model are due to an exclusive role of neuroligin 2 during the brain developmental period. However, recently published data showed that postnatal deletion of neuroligin 2 leads to reduced network inhibition in other brain regions.

In addition to the *in vivo* methods used in this project, experiments in non-anesthetized animals and measurements of single cells by whole-cell patch-clamp studies *in vitro* or *in vivo* should be considered. Attention should be paid to conditional protein elimination so that possible compensatory mechanisms can be largely excluded. Immunohistochemical imaging of the hippocampal preparations, as performed in the conventional knockout, could also prove informative for the function of neuroligin 2 in the adult hippocampus.

1 Einleitung

1.1 Hippocampus

1.1.1 Funktion des Hippocampus

In den 1950er Jahren weckte der Hippocampus als Hirnstruktur ein besonders großes Interesse in der Hirnforschung. Berühmt wurde damals ein Patient namens Henry Gustav Molaison (H.M.), bei dem eine Resektion beider medialer Temporallappen, inklusive bilateraler Zweidrittel der Hippocampi, durchgeführt wurde. Anlass zu diesem radikalen neurochirurgischen Eingriff gab eine therapierefraktäre Epilepsie, welche auf einen Ursprung im Temporallappen zurückgeführt wurde. Zwar konnten die epileptischen Anfälle dadurch besser kontrolliert werden, jedoch litt der Patient H.M. im Anschluss an die Operation bis zu seinem Lebensende an einer anterograden Amnesie. Erinnerungen, die der Patient H.M. vor der Operation erworben hatte, sowie sein für Sekunden bis Minuten funktionierendes Arbeitsgedächtnis blieben erhalten.¹⁻³

Diese Gedächtnisstörung erklärt sich durch die zentrale Beteiligung des Hippocampus an der Übertragung von neuen, expliziten Gedächtnisinhalten vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis.²⁻⁵ Das explizite Gedächtnis, welches bei dem Patienten H.M. nicht mehr funktionsfähig war, umfasst im Vergleich zum impliziten Gedächtnis die bewusste Erinnerung an vergangene Erlebnisse (Episodisches Gedächtnis), sowie bewusstes Erinnern an Wissen zu einzelnen Personen, Orten oder anderen Dingen (Semantisches Gedächtnis).^{3,4} Implizite Gedächtnisinhalte, die unbewusst, beispielsweise durch klassische Konditionierung, erlernt werden, konnte sich der Patient weiterhin aneignen.³ Die von dem Hippocampus bereits in den Neocortex transferierten Erinnerungen blieben erhalten, da diese dort unabhängig von der Hippocampusfunktion gespeichert sind.^{2,3} Auch die dementielle Symptomatik beim Morbus Alzheimer wird durch eine Funktionseinschränkung des expliziten Gedächtnisses erklärt: Durch Abbauprozesse und Neurodegeneration in den Hippocampi wird deren Funktionsfähigkeit im Laufe der Zeit erheblich eingeschränkt.⁴

Um zwischen zwei ähnlichen Erinnerungsepisoden oder zwei verwandten semantischen Gedächtnisinhalten klar zu unterscheiden, findet im Hippocampus die sogenannte Pattern separation statt. Essentiell für diese Funktion sind die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren im Gyrus Dentatus des Hippocampus, bei deren experimenteller Ausschaltung dieser wichtige Mechanismus inhibiert wird.^{3,6} Auch für die Pattern completion, bei der partielle Erinnerungen durch vorheriges Wissen vervollständigt werden, ist der Hippocampus unabdingbar.³ Eine Sonderstellung nimmt der Hippocampus außerdem ein, da es im Gyrus Dentatus zur lebenslangen Bildung neuer Nervenzellen kommt, der sogenannten adulten Neurogenese. Nach aktuellem Wissensstand findet die adulte Neurogenese nicht nur im Hippocampus, sondern ebenso in inhibitorischen Neuronen des Riechkolbens (Bulbus olfactorius) statt. Wenn nun die Bildung neuer exzitatorischer Körnerzellen im adulten Gyrus Dentatus unterdrückt wird, kommt es dadurch zur Beeinträchtigung von Lernprozessen und einer insuffizienten Gedächtnisbildung.^{3,7}

Läsionen des Hippocampus sind allerdings nicht nur an pathologischen Zuständen beteiligt, die das Lernen und die Gedächtniskonsolidierung betreffen. Die häufigste fokale Epilepsieform, die Temporallappenepilepsie, wird in höherem Lebensalter meist durch eine Sklerose des Hippocampus ausgelöst und zeichnet sich durch eine Zerstörung der inneren Hippocampusstruktur aus.⁸ Zudem übernimmt der Hippocampus als Bestandteil des limbischen Systems auch vegetative, emotionale und endokrine Funktionen.^{4,5} Des Weiteren liegt bei beidseitigen Läsionen der Hippocampi eine zeitliche, sowie räumliche Desorientierung vor.⁴ Dies lässt bereits die zentrale Rolle des Hippocampus für die räumliche Gedächtnisbildung, Orientierung in der Umgebung, sowie Navigation vermuten. Mit der Entdeckung der Ortszellen (place cells) im Jahre 1971, wurden erste Hinweise erbracht, dass der Hippocampus eine räumliche Karte der Umgebung repräsentiert.⁹ Sowohl Pyramidenzellen des Ammonshorns, als auch Körnerzellen des Gyrus Dentatus können als Ortszellen fungieren und somit an spezifischen Orten einer bestimmten Umgebung Signale entsenden.^{2,3} Außerdem beinhaltet der mediale entorhinale Cortex, welcher einen Hauptinput des Hippocampus bildet (s.u.), die sogenannten Gitterzellen (grid cells), welche für das Tier essentiell zur Navigation und Lokalisation im

Raum sind.^{2,10} Es gibt bereits erste Hinweise dafür, dass diese zwei Zelltypen nicht nur im Nagetier, sondern auch im Menschen vorkommen.¹¹

1.1.2 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus gilt als evolutionär alte Hirnstruktur, dessen Homologa in allen Kiefernäulern zu finden sind.¹² Er bildet beim Menschen den Archicortex, welcher sich vom sechsschichtigen Neocortex durch seine verminderte Schichtung differenzieren lässt. Im Laufe der Evolution hat sich der Hippocampus von seiner Position kranial des Corpus callosum durch Rotation des Archicortex nach kaudal in den medialen Temporallappen verlagert, wo er bei Primaten zu finden ist.^{2,4,12} Beim Menschen verläuft der Hippocampus beidseits medial der Seitenventrikel von seiner rostral gelegenen tatzenförmigen Pes hippocampi in einem Bogen nach hinten, oben bis unterhalb des Corpus Callosum (siehe Abbildung 1.1).^{4,5} In Nagetieren hingegen kommt der bananenförmige Hippocampus direkt unterhalb des Neocortex zum Liegen.¹³ Verglichen mit dem Hippocampus des Menschen ist dieser in Nagetieren relativ gesehen größer und weiter an der Oberfläche gelegen.²

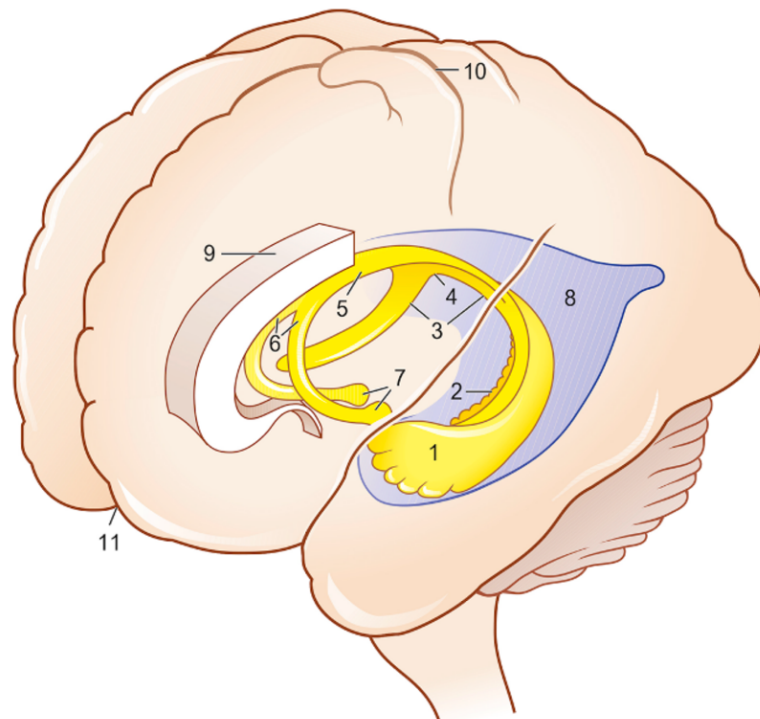


Abbildung 1.1: Lage des Hippocampus im menschlichen Gehirn⁴

Dargestellt ist hier lediglich der linke Hippocampus (1) mit dem linken Gyrus Dentatus (2). 3-6 bezeichnen verschiedene Bestandteile des Fornix cerebri, welche bis zu den Corpora mammillaria (7) reichen. Zudem ist auf der Abbildung das Hinterhorn des linken Seitenventrikels (8), sowie das Corpus Callosum (9) dargestellt. Zentraler Sulcus (10), Fissura longitudinalis cerebri (11)

Der Hippocampus setzt sich aus dem Gyrus Dentatus, dem Ammonshorn und dem Subiculum zusammen. Im Frontalschnitt des Hippocampuspräparates wird die U-Form des Hippocampus sichtbar, die vor allem durch die Windung des Ammonshorns gebildet wird. Das auch als Cornu Ammonis (CA) bezeichnete Ammonshorn kann in CA1-3 unterteilt werden, wobei am Ende des CA1 das Subiculum und am Ende des CA3 der nach hinten flektierte Gyrus Dentatus gelegen ist (siehe Abbildung 1.2). Die Differenzierung von CA1-3 erfolgt anhand der Zellgröße und Dichte der Pyramidenzellen des Cornu Ammonis: CA1 enthält kleine Pyramidenzellen, die den Hauptausgang des Hippocampus bilden, CA2 beinhaltet dichte, große Pyramidenzellen und CA3 schließt sich mit ebenso großen, aber weniger dicht gepackten Pyramidenzellen an.^{3,5}

Das Cornu Ammonis wird von dem Alveus hippocampi bedeckt, der den Hauptanteil der efferenten Fasern des Hippocampus in die dorsal gelegene Fimbria hippocampi und anschließend in den Fornix cerebri überleitet. Nach kaudal wird der Gyrus Dentatus durch den Sulcus hippocampi von dem Gyrus parahippocampalis separiert, in dessen Bereich auch der Entorhinale Cortex zu finden ist. Der sechsschichtige Entorhinale Cortex entsendet über den Tractus perforans den wichtigsten afferenten Input des Hippocampus und setzt sich anatomisch in das Subiculum fort.^{4,5,13}

Die Hauptzellschicht des CA1-3 bildet das Stratum pyramidale mit den Pyramidenzellen. In der Tiefe dieser Zellschicht lässt sich das Stratum oriens mit den inhibitorischen Korbzellen abgrenzen. Ein Alleinstellungsmerkmal des CA3 ist das Stratum lucidum direkt oberhalb des Stratum pyramidale. In allen Teilen des Ammonshorn wird das Stratum pyramidale von einem Stratum moleculare bedeckt, welches sich wiederum in das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare unterteilen lässt.^{5,13} Über den Tractus perforans werden die CA1 Pyramidenzellen direkt oder indirekt kontaktiert. Den direkten,

exzitatorischen Input erhält der CA1 über Fasern, die der dritten Zellschicht des Entorhinalen Cortex entspringen und im Stratum lacunosum-moleculare enden. In der zweiten Zellschicht des Entorhinalen Cortex hingegen beginnt der trisynaptische Erregungsweg, der über zwischengeschaltete exzitatorische Synapsen ebenso im CA1 endet und in dem folgenden Kapitel genauer erläutert wird.^{3,5}

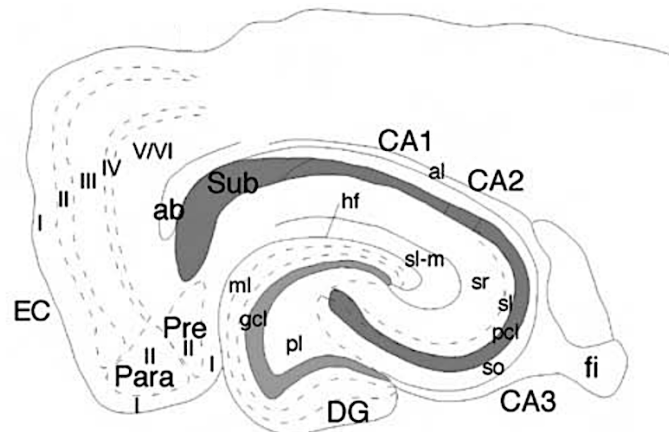


Abbildung 1.2 modifiziert nach¹³: Anatomischer Aufbau der Hippocampusformation
 Anhand dieses horizontalen Schnittes durch den Hippocampus einer Ratte, lässt sich die Schichtung und der anatomische Aufbau der Hippocampusformation und v.a. des Gyrus Dentatus (s.u.) nachvollziehen: Sechsschichtiger Entorhinaler Cortex (EC), Subiculum (Sub), Präsubiculum (Pre), Parasubiculum (Para), Fimbria hippocampi (fi), Fasertrakt mit Tractus Perforans (ab), Hippocampale Fissur (hf) Cornu Ammonis (CA) mit Alveus (al), Stratum oriens (so), Pyramidenzellschicht (pcl), Stratum lucidum (sl), Stratum radiatum (sr) und Stratum lacunosum-moleculare, Gyrus Dentatus (DG) mit ml (Stratum moleculare), gcl (Stratum granulosum) und pl (Stratum multiforme).

1.1.3 Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus

Der Gyrus Dentatus besteht aus der Fascia dentata und dem Hilus, welcher sich mit seiner polymorphen Schicht in den CA3 fortsetzt. An die innere polymorphe Schicht (Stratum multiforme) des Gyrus Dentatus grenzt die zentral gelegene Körnerzellschicht (Stratum granulosum), welche von der äußeren zellarmen molekularen Schicht (Stratum moleculare) abzugrenzen ist (siehe Abbildung 1.2). Das Stratum moleculare lässt sich in eine innere, mittlere und äußere Schicht unterteilen, in denen jeweils verschiedene Nervenfasern enden. Der Gyrus Dentatus bildet eine liegende U/V-Form, jedoch in entgegengesetzter Richtung

zum Hippocampus, und umschließt mit dem offenen Ende des Buchstabens U/V den CA 3, sodass sich ein supra- und infrapyramidal des CA 3 liegender Anteil des Gyrus Dentatus herauskristallisieren lässt. ^{4,13}

Das Stratum moleculare des Gyrus Dentatus enthält vor allem die Dendriten der Körnerzellen, sowie in der äußeren und mittleren Molekularschicht die Axone des Tractus perforans.¹³ Der Tractus perforans wird in einen lateralen und medialen Anteil unterteilt. Diese Nomenklatur ergibt sich draus, dass Fasern aus dem lateralen Entorhinalen Cortex in dem oberflächlichen Drittel, Fasern aus dem medialen Entorhinalen Cortex hingegen in dem mittleren Drittel des Stratum moleculare enden.¹³ Diese Unterscheidung ist auch funktionell relevant, da der mediale Tractus perforans für die Übermittlung von räumlichen Informationen, der laterale Tractus perforans hingegen für die Detektion visueller Objekte sowie für die zeitliche Strukturierung von Erinnerungen zuständig ist.^{14–16} Die Körnerzellen erhalten im Stratum moleculare über die Axonen der Neurone des Entorhinalen Cortex (Cortexschicht II) exzitatorischen Input (1. Synapse) und bilden somit den Beginn des bereits erwähnten trisynaptischen Erregungswegs (siehe Abbildung 1.3).^{17,18} Neben dem Stratum moleculare des Gyrus Dentatus enden diese Axone auch im Stratum lacunosum-moleculare des CA3.¹⁹ Die CA3 Pyramidenzellen werden jedoch hauptsächlich durch unmyelinisierte Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern, innerviert (2. Synapse). Die Moosfasern enden im Stratum lucidum des CA3. Der CA3 wiederum entsendet rückläufige Schaffer-Kollaterale, die mit den Dendriten der CA1 Pyramidenzellen verschaltet sind (3. Synapse).^{2,3,5,13}

Die Moosfasern bilden auf dem Weg zum CA3 weitere Synapsen mit den proximalen Dendriten der Hauptzellen des Stratum multiforme, den Mooszellen. Zudem entsenden die Moosfasern zahlreiche dünne Kollaterale im Stratum multiforme, welche beispielsweise die pyramidalen Korbzellen oder andere GABAerge Interneurone innervieren. Die pyramidalen Korbzellen sind inhibitorische Interneurone, welche zwischen dem Stratum granulosum und Stratum multiforme gelegen sind. Sie umschließen die Körnerzellen mit ihren plexusartigen, korbformigen Axonen. So werden die Zellkörper sowie die proximalen Apikaldendriten der Körnerzellen inhibiert. Die Dendriten der

exzitatorischen Mooszellen²⁰ breiten sich im Stratum multiforme aus, die Axone hingegen bilden nicht nur einen Plexus im Stratum multiforme, sondern innervieren auch das innere Drittel des ipsilateralen Stratum moleculare. Die Axone der Mooszellen erreichen außerdem die innere kontralaterale Molekularschicht und bilden damit eine Kommissur.^{13,21}

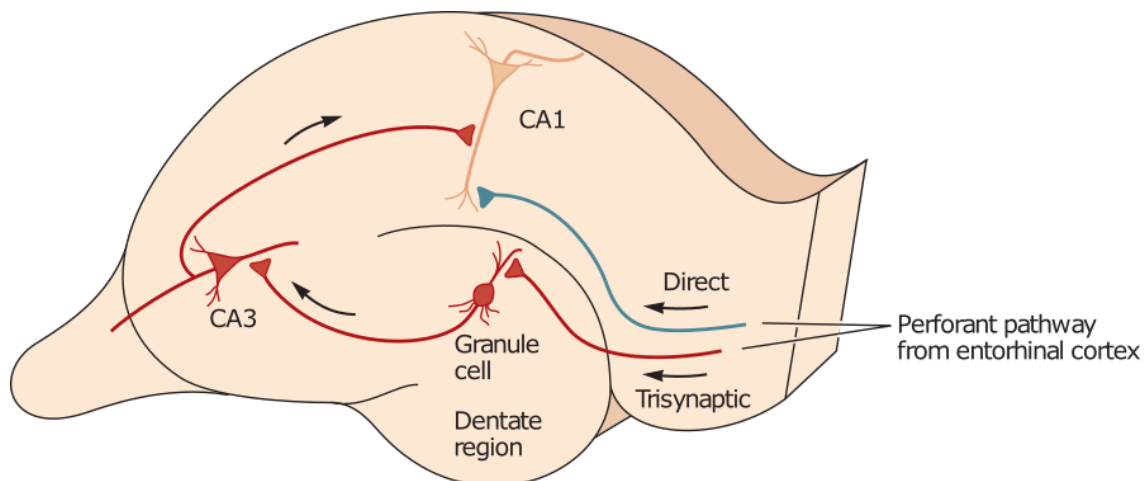


Abbildung 1.3 modifiziert nach³: Vereinfachte Darstellung des direkten und trisynaptischen Erregungsweges im Hippocampus

Die in beige dargestellte Pyramidenzelle des CA1 erhält den direkten Input (in Blau dargestellt) über die Fasern des Entorhinalen Cortex, welcher über den Tractus perforans fortgeleitet wird. Des Weiteren entsendet der Tractus perforans über den trisynaptischen Weg (in Rot dargestellt) exzitatorischen Input an die Körnerzelle des Gyrus Dentatus, welche wiederum die CA3 Pyramidenzelle erregt. Letztere ist für die Signalübertragung an die CA1 Pyramidenzelle verantwortlich.

1.2 Übertragung an der Synapse und Plastizitätsmechanismen

1.2.1 Grundlagen der synaptischen Signalübertragung

Einzelne Nervenzellen kommunizieren über sogenannte Synapsen, die eine Signalübertragung und auch Modulation dieser Signale ermöglichen. Im menschlichen Gehirn existieren zwischen 10^{14} und 10^{15} dieser synaptischen Verbindungen.³ Der Begriff „Synapse“ wurde bereits im Jahr 1897 eingeführt, um einen Kontakt zweier Elemente trotz gestörter Konnektivität zu beschreiben.²² Diese zwei Elemente bestehen aus der präsynaptischen Membran einer Nervenzelle, welche das Signal sendet und der postsynaptischen Membran einer Nervenzelle, die wiederum als Empfänger fungiert. Die Präsynapse ist am Axon

lokalisiert, die Postsynapse hingegen am Dendriten oder Soma des Neurons. An der chemischen Präsynapse gelangen die durch ein elektrisches Aktionspotential ausgeschütteten Neurotransmitter über den synaptischen Spalt (20-40 nm) zur gegenüberliegenden Postsynapse. Die Transmitter wiederum binden meist an postsynaptische ionotrope (Ionenkanal) Rezeptoren, welche das Membranpotential an der postsynaptischen Membran so verändern, dass das Auslösen eines Aktionspotentials entweder begünstigt (= excitatory postsynaptic potential = EPSP) oder erschwert (= inhibitory postsynaptic potential = IPSP) wird.³

1.2.2 Kurzzeitplastizität

Für die Kurzzeitplastizität sind vor allem die präsynaptischen Abläufe von Relevanz, wie beispielsweise die Eigenschaften der fusionierenden Vesikel oder Calcium, das über indirekte Mechanismen zur Vesikelfusion und damit zur Neurotransmitterausschüttung führt. Die Vorgänge an der Prä- und Postsynapse sind im Detail nochmals in der Abbildung 1.4 beschrieben.

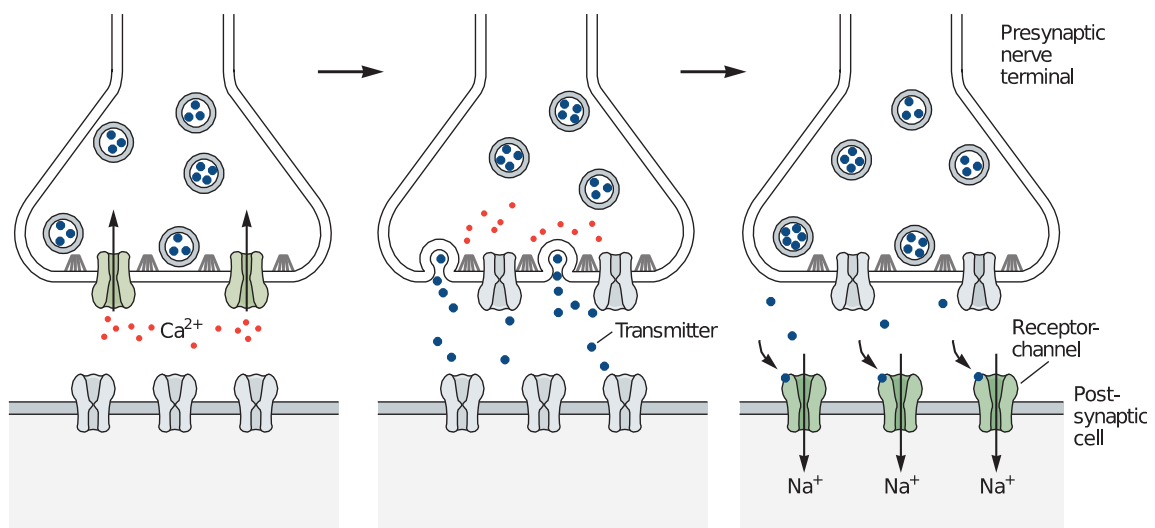


Abbildung 1.4 modifiziert nach³: Signalübertragung an der chemischen Synapse

In dem Ende des Axons, dem Synapsenendknöpfchen, befinden sich die mit Neurotransmittern gefüllten synaptischen Vesikel. Wenn ein Aktionspotential die Präsynapse über das Axon erreicht, werden spannungsabhängige Calciumionenkanäle geöffnet und die intrazelluläre Calciumkonzentration an der Präsynapse steigt an. Anschließend fusionieren die Vesikel mit der präsynaptischen Membran, sodass die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Postsynaptische Ionenkanäle werden entweder direkt (in der Abbildung dargestellt) oder

indirekt (über zwischengeschaltete metabotrope Rezeptoren) durch die Neurotransmitter geöffnet und führen dadurch zur weiteren Signalübertragung.

Neben den präsynaptischen Mechanismen können auch postsynaptische Vorgänge auf die Kurzzeitplastizität Einfluss nehmen. Des Weiteren spielt das Rest-Calcium, welches im Verlauf der Signalübertragung in der präsynaptischen Endigung verbleibt, für die molekularen Mechanismen der Kurzzeitplastizität eine tragende Rolle.²³ Der Effekt der Doppelpuls-Fazilitierungsmessungen (Paired-Pulse Facilitation, PPF) steigt mit diesem Rest-Calcium linear an.²⁴ Bei diesem elektrophysiologischen PPF-Protokoll wird die Präsynapse unterschwellig gereizt, sodass keiner der beiden Doppelpulse einen Populationsspike auslöst. Bei doppelter Reizung in geringem Zeitabstand hintereinander (kurzes Interpulsintervall) wird das zweite EPSP größer als das erste EPSP ausfallen. Somit wird in unseren Experimenten kurzfristig die Tractus Perforans-Gyrus Dentatus Synapse gestärkt, was man als Kurzzeitfazilitierung zur Überprüfung der Kurzzeitplastizität bezeichnet.

1.2.3 Langzeitplastizität

Synaptische Verbindungen, sowie deren Verstärkung und Abschwächung (Plastizität) sind unerlässlich für die Gedächtnisbildung und Lernprozesse. Im Jahre 1949 formulierte Donald Olding Hebb in seinem Buch „The Organization of Behavior“ die Hebbsche Lernregel, welche einen wichtigen Grundsatz der synaptischen Plastizität bereits beschreibt:

„Let us assume then that the persistence or repetition of a reverberatory activity (or "trace") tends to induce lasting cellular changes that add to its stability (...) When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased".²⁵

Dies bedeutet im neuronalen Kontext, dass eine kontinuierliche und wiederholte Stimulation einer postsynaptischen Nervenzelle durch eine präsynaptische Nervenzelle die synaptische Signalübertragung verstärkt. Experimentell konnte diese Hypothese durch die Entdeckung der Langzeitpotenzierung (LTP) im Gyrus Dentatus des Kaninchens bestätigt werden.²⁶ Wie auch in unserem Versuchsablauf wurde hier der Tractus Perforans stimuliert und LTP *in vivo* in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus induziert. LTP beschreibt die lang

andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung, welche durch eine tetanische hochfrequente, präsynaptische Stimulationsabfolge ausgelöst werden kann.²⁶

Auf molekularer Ebene wird durch die hochfrequente Stimulation die intrazelluläre Calciumkonzentration an der Postsynapse erhöht, indem Calciumionen durch ionotrope postsynaptische Glutamatrezeptoren, die NMDA-Rezeptoren, in das Zellinnere gelangen. Diese NMDA-Rezeptor abhängige Form des LTP ist am ausführlichsten untersucht, allerdings nicht die einzig existierende LTP Form.²⁷ Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen Kurzzeitplastizität ist eine spezifische Eigenschaft des LTPs, über einen gewissen Zeitraum anzuhalten, was beispielsweise im Gyrus Dentatus bis zu mehreren Monaten der Fall sein kann.²⁸ Neben dieser Beständigkeit des LTPs spielt die Kooperativität eine große Rolle, welche eine bestimmte Intensitätsschwelle zur erfolgreichen LTP-Induktion voraussetzt. Dies bedeutet, dass die Intensität der Depolarisation von ausreichender Größe sein muss, um den Magnesiumblock des NMDA Rezeptors zu entfernen, sodass es zum Calciumeinstrom kommen kann. Eine weitere Eigenschaft des LTPs, die Inputspezifität, wird dadurch erklärt, dass präsynaptisch eine bestimmte Glutamat Konzentration vorliegen muss, um eine ausreichende Anzahl an NMDA-Rezeptoren zu aktivieren. Inputs, die zu anderen Zeiten eingehen, werden somit nicht potenziert. Wenn ein einzelner Input zu schwach ist, um LTP zu induzieren, kann es über eine Kombination eines schwachen und starken, depolarisierenden Inputs zur Langzeitpotenzierung beider Inputs kommen. Dies wird als Assoziativität bezeichnet, welche oft in den Zusammenhang mit den zellulären Mechanismen der klassischen Konditionierung gebracht wird. Der NMDA-Rezeptor fungiert somit als Koinzidenzdetektor, da sowohl der durch die präsynaptische Aktivierung ausgelöste Glutamat Anstieg, als auch eine postsynaptische Depolarisation notwendig ist, um diesen Rezeptor zu aktivieren.^{29,30} In Folge des intrazellulären Anstiegs der Calciumkonzentration sowie der Aktivierung des NMDA-Rezeptors wird die Proteinkinase CaMKII (Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) langfristig aktiviert, welche maßgeblich an der LTP-Aufrechterhaltung beteiligt ist. CaMKII führt unter anderem zu einer Phosphorylierung von AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Rezeptoren, was eine erhöhte

Durchlässigkeit und ein vermehrtes Recycling dieser Rezeptoren zur Folge hat. Durch die erhöhte Anzahl und Effizienz der AMPA-Rezeptoren, welche als ionotrope transmembrane Rezeptoren für Glutamat im zentralen Nervensystem fungieren, kommt es zur stärkeren Depolarisation der postsynaptischen Membran.³¹ AMPA-Rezeptoren sind somit essentiell für die frühe Phase der LTP-Induzierung. In der späten LTP Phase werden weitere molekulare Mechanismen, wie beispielsweise die Proteinsynthese in Gang gesetzt, die zur erfolgreichen Langzeitpotenzierung notwendig sind.³² Es kann auch zu einer andauernden Abschwächung der synaptischen Übertragung kommen, was als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet wird und ähnliche molekulare Mechanismen wie bei der Langzeitpotenzierung involviert.³

1.3 Neuroigin 2

1.3.1 Klinische Relevanz von Neuroigin 2

Im Jahre 1996 wurde das Protein Neuroigin 2 (Nlgn2) von Ichtchenko et al. erstbeschrieben. Bereits in dieser ersten Referenz wird die Exklusivität hoher Nlgn2 Konzentrationen im Gehirn hervorgehoben.³³ Zahlreiche Studien können seither Veränderungen der Neuroigin Familie auch im klinischen Setting mit pathologischen Beeinträchtigungen der Hirnfunktion verknüpfen. Beim Menschen gibt es insgesamt fünf verschiedene Gene der Neuroigin Familie, Nlgn1, Nlgn2, Nlgn3, Nlgn4X und Nlgn4Y, wohingegen man im Nagetier nur Neuroigin 1-4 unterscheidet.^{34,35} Insbesondere neuropsychiatrische Erkrankungsbilder sind mit diversen Veränderungen der Neuroigin-Familie assoziiert.³⁶ Hierbei ist vor allem der Zusammenhang zwischen den Neuroiginen, hauptsächlich Nlgn3 und Nlgn4, und den Autismus-Spektrum-Störungen hervorzuheben.³⁷⁻³⁹ Für Neuroigin 2 im Speziellen ist der Zusammenhang mit dem psychiatrischen Erkrankungsbild der Schizophrenie mithilfe von menschlichen Daten aufgezeigt worden.⁴⁰ Des Weiteren lassen sich bei therapierefraktären depressiven Patienten im Nucleus accumbens, dem Belohnungssystem des Gehirns, eine verminderte Anzahl von Nlgn2 Transkripten finden.⁴¹ Im Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass ein globaler Knockout von Nlgn2 zu auffälligen Verhaltensveränderungen, wie

verstärktes ängstliches Verhalten und verminderter Schmerzempfindlichkeit führt.⁴² Zudem wurde gezeigt, dass dieser ängstliche Phänotyp mit einer Beeinträchtigung der inhibitorischen synaptischen Transmission in der Amygdala einhergeht.⁴³ Dieser Teil des Gehirns spielt wiederum eine zentrale Rolle für die Kontrolle von Emotionen, insbesondere der Angst. In einer Fallbeschreibung eines 15-Jährigen wurde 2017 dargestellt, dass ein exklusiver Funktionsverlust des Nlgn2 Proteins in Form einer heterozygoten Nonsense-Mutation mit schweren Einschränkungen, wie Symptomen einer Angststörung, Autismus, Intelligenzminderung und einem gestörten Essverhalten assoziiert sein kann.⁴⁴

1.3.2 Funktion von Neuroligin 2 an der Synapse

Nlgn2 ist ein Zelladhäsionsprotein (CAM = cell adhesion protein), welches an der postsynaptischen Membran der inhibitorischen Synapse lokalisiert ist.⁴⁵ Bei Fehlen dieses Proteins wird die Entwicklung, Reifung und Funktion der inhibitorischen Synapse gestört, während die Anzahl und Struktur der inhibitorischen Synapsen, sowie die exzitatorische Synapse in ihrer Funktion unbeeinträchtigt bleibt.^{42,46–48} Auch wenn Nlgn2 ubiquitär an inhibitorischen Synapsen lokalisiert ist, beeinflusst es vornehmlich die Zusammensetzung und Funktion perisomatischer inhibitorischer Synapsen, welche vor allem Parvalbumin-positiven Interneuronen entspringen.^{46,47} Das Protein Nlgn2 ist essentiell für eine ungestörte inhibitorische synaptische Transmission sowie für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Exzitation und Inhibition im Gehirn.⁴⁹ Verbindungen zu anderen neuronalen Zelladhäsionsproteinen, wie beispielsweise zu dem präsynaptischen β -Neurexin,³³ sind von zentraler funktioneller Bedeutung. Die Neuroligine, welche bereits bei ihrer Entdeckung als Neurexin bindende Partner beschrieben wurden,⁵⁰ spielen gemeinsam mit ihren Interaktionspartnern eine wichtige Rolle bei der funktionellen Verbindung der Prä- und Postsynapse und der Transmission am synaptischen Spalt.³⁶ Neuroligin 2 besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, die sich dem N-Terminus des Proteins anschließt. Diese Domäne ähnelt der Acetylcholinesterase, unterscheidet sich allerdings dadurch, dass sie katalytisch inaktiv ist. Eine weitere Domäne verbindet die extrazelluläre Domäne mit der Transmembrandomäne des Proteins. Der kurze, intrazelluläre C-Terminus von

Neurologin 2 enthält eine PDZ-Domäne, um mit anderen Proteinen interagieren zu können.^{33,35,45} Die extrazelluläre Domäne von Nlgn2 bindet das präsynaptische β -Neurexin, welches wiederum mit der CASK (calcium/calmodulin-dependent serin protein kinase) und dem Gerüstprotein Munc18 (mammalian uncoordinated-18) in Verbindung steht.⁵¹ Mithilfe von α -Neurexinen bilden sich Nlgn2-Cluster, die wiederum für die weitere Signalübertragung an der Postsynapse essentiell sind.^{52,53,46} Auf postsynaptischer Seite ist Nlgn2 von zentraler Bedeutung, um die Funktion inhibitorischer Synapsen zu gewährleisten.³⁴ Nlgn2 ist postsynaptisch mit dem Gerüstprotein S-SCAM (synaptic scaffolding molecule) und Collybistin, einem gehirnspezifischen GDP/GTP- Austauschfaktor (Guanosindiphosphat / Guanosintriphosphat), verknüpft.^{52,54} Der intrazelluläre C-Terminus von Nlgn2 ist für die Aktivierung von Collybistin verantwortlich, welches wiederum zur Gruppierung des inhibitorischen, postsynaptischen Gerüstproteins Gephyrin führt.^{46,47} Durch das Zusammenspiel aus Nlgn2, Collybistin und Gephyrin werden GABA_A- und Glycin Rezeptoren, die für die Funktion der inhibitorischen Synapse essentiell sind, an die postsynaptische Membran rekrutiert. Dadurch können die an der Präsynapse freigesetzten Transmitter zu den auf der postsynaptischen Seite lokalisierten inhibitorischen Rezeptoren gelangen.⁴⁶

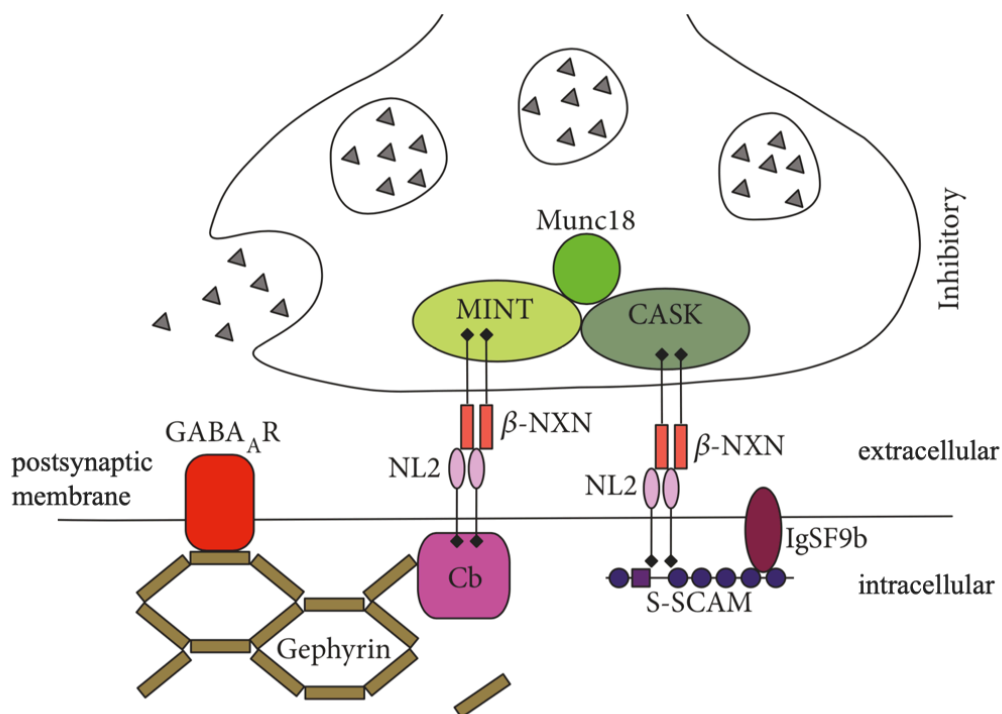


Abbildung 1.5 modifiziert nach⁵¹: Interaktionspartner von Neurologin 2 an der inhibitorischen postsynaptischen Membran

Präsynaptisch interagiert β -Neurexin (β -NXN), einer der wichtigsten Interaktionspartner von Nlgn2, indirekt mit Munc18 über MINT (Munc18 interacting protein) und CASK. An der postsynaptischen Membran bindet Nlgn2 an Collybistin (Cb) und das synaptic scaffolding molecule (S-SCAM). Die Rekrutierung von GABA_A-Rezeptoren an die postsynaptische Membran durch die Komplexbildung von Collybistin und Gephyrin wird in der Abbildung ebenso dargestellt.

1.3.3 Rolle von Neuroligin 2 im Gyrus Dentatus

Die Stimulation des Tractus Perforans und Ableitung von Potentialen (evoked fEPSPs) an der Tractus Perforans - Körnerzell - Synapse *in vivo* eignet sich hervorragend zur Untersuchung von synaptischer Übertragung, Plastizität sowie der Erregbarkeit des Gyrus Dentatus.²⁶ Jedlicka et al. (2011) verglich diese Mechanismen in Nlgn2 Knockout Mäusen mit dem entsprechenden Wildtyp, um der Rolle von Nlgn2 in der Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus nachzugehen. Bei Nlgn2 Knockout Mäusen zeigt sich in den elektrophysiologischen Untersuchungen eine stark erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Abbildung 1.6). Patch-Clamp Experimente in akuten hippocampalen Schnitten von adulten Nlgn2 Knockout Mäusen bestätigen diese Beobachtung, da hier die Amplitude der GABAergen miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) der Körnerzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert ist. Während der Doppelpulsstimulierung des Tractus Perforans ist bei geringen Interpulsintervallen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen eine Inhibition (PPI = Paired-Pulse Inhibition), bei größeren Intervallen eine Vergrößerung der Populationsspikes (PPDI = Paired-Pulse Disinhibition) festzustellen. Passend zu einer geminderten GABAergen Netzwerkinhibition, welche sich mithilfe dieser Messung objektivieren lässt, zeigt sich die PPI Amplitude beim Fehlen von Nlgn2 vermindert sowie die PPI/PPDI Kurve nach links zugunsten einer verfrühten PPDI verschoben. Da keine Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen bezüglich der Slope der fEPSP-Messung, ein Maß für die synaptische Effizienz, festgestellt werden können, ist davon auszugehen, dass die exzitatorische Tractus - Körnerzell - Synapse im Nlgn2 Knockout Modell unbeeinträchtigt bleibt. Die präsynaptischen Mechanismen an der Tractus Perforans-Körnerzellschicht Synapse, welche mithilfe der Doppelpuls-Fazilitierung (s.o.) in Nlgn2 Knockout Mäusen *in vivo*

gemessen werden können, zeigen ebenso keine Veränderungen auf. Eine LTP-Induktion ist trotz Abwesenheit von Nlgn2 weiterhin möglich. Zudem wird die Zusammensetzung der inhibitorischen Synapse durch den Nlgn2 Knockout verändert: In der Immunhistochemie zeigt sich eine verminderte Dichte von postsynaptischen GABA_A-Rezeptor- und Gephyrin-Clustern (γ 2-Untereinheit) und reduzierte Kolo-kalisation in der Körnerzellschicht von Nlgn2 Knockout Mäusen. Diese Veränderungen sind spezifisch für die Körnerzellschicht, die vor allem die Somata der Körnerzellen beinhaltet und gilt nicht für die Molekularschicht, welche insbesondere die Dendriten der Körnerzellen enthält (Abbildung 1.7). Diese verminderte somatische Inhibition von Körnerzellen in Nlgn2 Knockout Mäusen konnte auch mithilfe eines Computermodells vorhergesagt werden.⁴⁹ Ähnliche Beobachtungen in Nlgn2 Knockout Mäusen können nicht nur in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus, sondern auch in den Pyramidenzellen des Ammonshorns (CA1) beobachtet werden.⁴⁶ Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nlgn2 im Netzwerk des Gyrus Dentatus *in vivo* für die GABAerge Inhibition, das Verhältnis von neuronaler Exzitation zu Inhibition, sowie die Cluster Bildung von GABA_A-Rezeptoren und Gephyrin von großer Bedeutung ist.^{46,49,51}

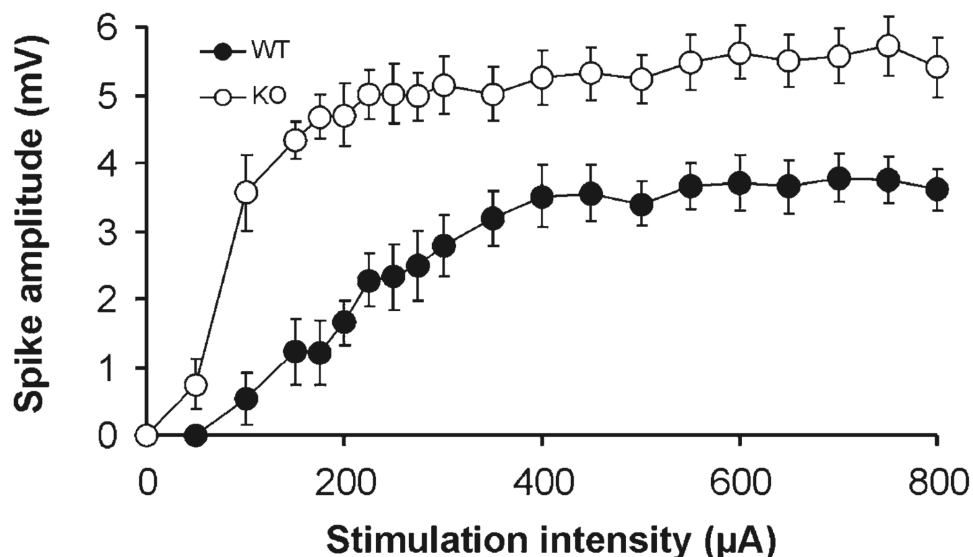


Abbildung 1.6: Erhöhte Erregbarkeit von Körnerzellen in Nlgn2 Knockout Mäusen⁴⁹

Auf der Abbildung zeigt sich eine erhöhte Erregbarkeit in Form eines Anstiegs der Amplitude des Populationsspikes von Körnerzellen des Gyrus Dentatus in der Abwesenheit von Nlgn2 *in vivo*. Gemessen wird das Input-Output-Verhältnis für die Amplitude des Populationsspike, welches die Anzahl und Synchronität der feuernenden Körnerzellen widerspiegelt. $n(\text{WT}):12$; $n(\text{Nlgn2 KO}):10$

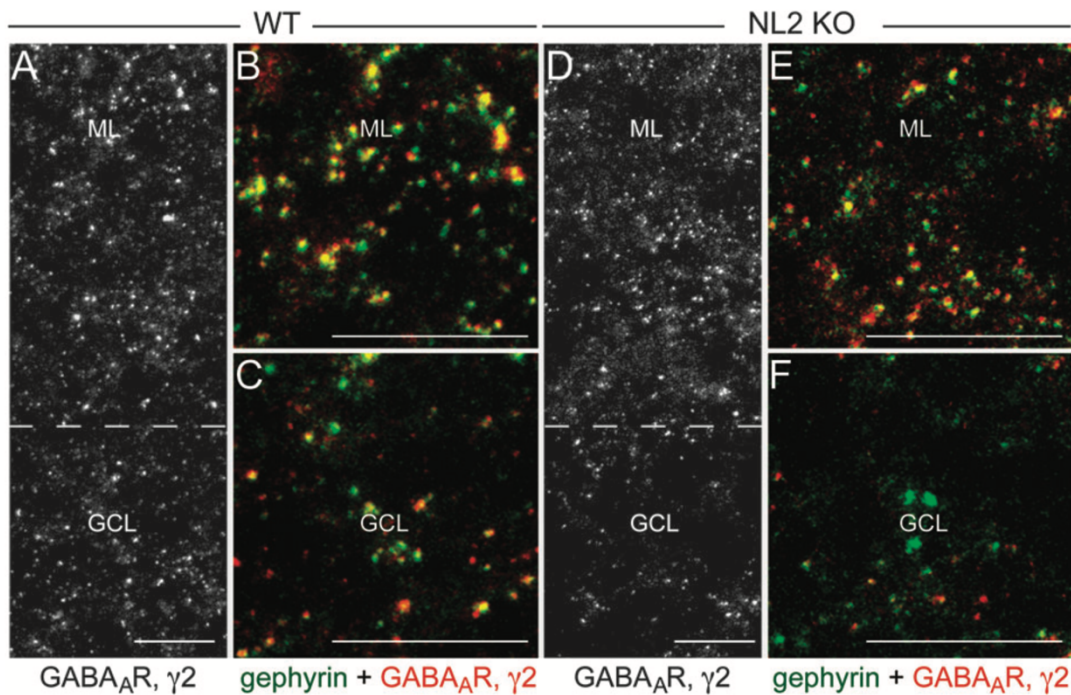


Abbildung 1.7: Nlgn2 KO Mäuse zeigen eine Reduktion der somatischen GABA_AR-Cluster (γ 2-Untereinheit) und des postsynaptischen Gephyrin⁴⁹

In der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus kann in Nlgn2 Knockout Mäusen sowohl eine Reduktion der somatischen GABA_AR-Cluster als auch eine reduzierte Kolokalisation von der γ 2-Untereinheit des GABA_A Rezeptors und Gephyrin festgestellt werden. Speziell die γ 2-Untereinheit des GABA_ARezeptors wird für die Clusterbildung benötigt.⁵⁵ In der Molekularschicht können diese beobachteten Reduktionen nicht beobachtet werden.

1.4 Fragestellung der Doktorarbeit

Beim Menschen treten kognitive Beeinträchtigungen, mit denen Veränderungen der Neuroligin 2 Expression assoziiert sind, meist erst nach einem gewissen Entwicklungseffekt – folglich postnatal – auf. In den meist verwendeten Tiermodellen konnte ein unspezifischer Effekt auf die Entwicklung der Tiere durch den Mangel an Neuroligin 2 bei bereits pränatal erfolgter Deletion (konventionelle KOs) nicht ausgeschlossen werden. Somit ist bisher unklar geblieben, ob Neuroligin 2 auch im Gyrus Dentatus adulter Mäuse noch eine tragende Rolle spielt oder vor allem in der Phase der Hirnentwicklung von Bedeutung ist. Um diese Fragestellung anzugehen, ist es notwendig, die Deletion von Neuroligin 2 erst postnatal zu induzieren, sodass Entwicklungseffekte einer vorherigen Deletion verhindert werden und festgestellt werden kann, welche

Rolle Neuroligin 2 in bereits voll entwickelten Mäusen spielt. Mithilfe eines konditionalen Neuroligin 2 Knockout Modells kann nach vollständiger Entwicklung der Mäuse die synaptische Transmission *in vivo* an der exzitatorischen Tractus perforans-Körnerzell Synapse untersucht werden, indem der mediale Tractus perforans stimuliert und evozierte fEPSPs gemessen werden. Das Ziel dieser Dissertation ist es somit, den Einfluss der postnatalen Neuroligin 2 Deletion auf die synaptische Übertragung, Plastizität und neuronale Exzitabilität von Körnerzellen im Gyrus Dentatus in adulten Mäusen *in vivo* zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Hersteller (Herstellernummer/PZN)
β -Mercaptoethanol	AppliChem (A1108)
Acrylamid 4K Lösung 30%	AppliChem (A0951)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth (9592.3)
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH (01578681)
CHAPS	AppliChem (A1099)
cOmplete Tablets, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (04693124001)
Filterpapier	Bio-Rad (1703965)
Glycerin wasserfrei	AppliChem (A1123)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (I9516)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	Braun (1640026)
Maisöl	Sigma-Aldrich (C8267)
Methanol pA	CIVD-Apotheke (130158)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (31434-1KG-R)
Nitrozellulosemembran, 8,5 x 5,5 cm	Protran
Normofundin G-5 Infusionslösung	Braun
PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Sigma-Aldrich (04906837001)
Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad (161-037)
Robinul (Glycopyrroniumbromid) 0,2mg/ml	Biosyn Arzneimittel GmbH (01894117)
SDS Solution 10%	AppliChem (A0676)
SDS ultrapure	AppliChem (A1112)
Tamoxifen freie Base	Sigma-Aldrich (T5648)
TEMED	AppliChem (A1148)
TRIS ultrapure	AppliChem (A1086)
Tween 20	AppliChem (A1389)
Urethan	Sigma-Aldrich (U2500)
Xylonest (1% Prilocainhydrochlorid mit Adrenalin 1:200 000)	Aspen Germany GmbH

2.1.2 Puffer und Gele

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Puffer in Wasser angesetzt.

Tabelle 2: Puffer und Gele

Puffer und Gele	Zusammensetzung
1 x TBS-Puffer (1 l)	1:10 Verdünnung von 10 x TBS-Puffer
10 x TBS-Puffer (1 l)	20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,6
Blockierungspuffer	33,3% (v/v) TBS 66,7% (v/v) Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting, ROCKLAND (MB-070)
Elektrophoresepuffer (1 l)	100 ml SDS-Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3
Homogenisierungspuffer	20 mM Tris pH 7,5 500 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % (w/v) CHAPS Zugabe pro 10 ml: 1 Tablette PhosSTOP Zugabe pro 10 ml: 1 Tablette cOmplete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail
Laemmli Sample Buffer von Bio-Rad (161-0737) ⁵⁶	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 25% (v/v) Glycerin 2% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgel (4% Acrylamid-Gel)	6,1 ml ddH ₂ O 2,5 ml Sammelgelpuffer 1,3 ml Acrylamid-Lösung 50 µl TEMED 100 µl 10% APS
Sammelgelpuffer (500 ml)	30,2 g Tris pH 6,8 2 g SDS
SDS-Tris-Glycin-Puffer (10x)	AppliChem (A1415)
TBS-T-Puffer (1 l)	10% (v/v) 10xTBS 0.1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8,3
Trenngel (8% Acrylamid-Gel)	4,7 ml ddH ₂ O 2,5 ml Trenngelpuffer 2,7 ml 30% Acrylamide 4 K Lösung 25 µl TEMED 50 µl 10% APS

Trenngelpuffer (500ml)	90,88 g Tris pH 8,8 2 g SDS in 500ml 500 ml H ₂ O
Verdünnungspuffer für Antikörper	50% (v/v) TBS-T-Puffer 50% (v/v) Blocking Buffer for Fluorescent Western Blotting, ROCKLAND (MB-070)

2.1.3 Kits

Tabelle 3: Kits

Kits	Hersteller (Herstellernummer)
Quant-iT Protein Assay Kit	ThermoFisher SCIENTIFIC (Q33211)

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Name	Verdünnung	Inkubationstemperatur/ -zeit
1. Neuroligin 2 - Polyclonal rabbit purified antibody, Synaptic Systems (129 203)	1:1000	4°C, über Nacht
2. 800 Goat anti-rabbit IgG Secondary Antibody, LI-COR (926-32211)	1: 10 000	RT, 30 min
3. Anti-GAPDH – Mouse monoclonal antibody, Sigma-Aldrich (CB1001)	1: 10 000	RT, 30 min
4. 680 Goat anti-mouse IgG Secondary Antibody, LI-COR (926-68070)	1: 10 000	RT, 30 min

2.1.5 Geräte und Plastikware

Tabelle 5: Geräte und Plastikware

Geräte und Plastikware	Hersteller (Herstellernummer)
-80°C Kühlschrank	EWALD Innovationstechnik GmbH (V86-720.1)
10 ml Pipette CELLSTAR	Greiner Bio-One International (607 180)
4°C Kühlschrank	Liebherr (FKS 2600)
Analog-Digital-Signalwandler	Molecular Devices Cellular Neuroscience, Axon Instruments (Digidata 1440A)
BD Plastipak Tuberkulinspritzen 1 ml	Becton Dickinson (303172)
Fluorometer Qubit	ThermoFisher SCIENTIFIC (Q32857)
Gel Releasers	Bio-Rad (1653320)

Hamilton Spritze 5 µl	HAMILTON (7634-01)
Heizkissen	Beurer (HK35)
Heizplatte mit Temperaturregulation	Physitemp (TCAT-2LV)
Homogenisierer Aufsätze: DISPOSABLE PELLET PESTLES	KIMBLE (749521-1500)
Homogenisierer: CORDLESS PELLET PESTLE	KIMBLE (749540-0000)
Lautsprecher	Grass Medical Instruments, Quincy, Mass.,USA (Grass AM8 Audio)
Messzylinder	Brand
Metallschlundsonde	Havard Apparatus (75-0281)
Mikroreaktionsgefäß: Multiply-Pro Gefäß 0,5 ml	Sarstedt (72.735.002)
Mikroreaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf (0030 123.328)
Mikroskope	ZEISS OPMI 1 FC ZEISS STEMI 2000
Mini-PROTEAN Comb, 15 well, 1.0 mm, 26 µl	Bio-Rad (1653360)
Mini-PROTEAN Short Plates	Bio-Rad (1653308)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad (1658000EDU)
Petrischalen, Corning Falcon	ThermoFisher SCIENTIFIC (351029)
Petrischalen, Corning Falcon	ThermoFisher SCIENTIFIC (351008)
Pipetten 5000 µl 1000 µl 100 µl 10 µl 0.1-2,5 µl	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet	Brand
Röhrchen 15 ml CELLSTAR Polypropylen	Greiner Bio-One International (188271)
Röhrchen 50ml CELLSTAR Polypropylen	Greiner Bio-One International (227261)
Rollenmischer RM-30V	CAT (Zipperer GmbH)
Rotamix	Appropriate Technical Resources
Spritze mit Nadel 1 ml	Terumo (SS+01T25161)
Stereotaktische Geräte	David Kopf Instruments, Tujunga, CA
Stereotaktisches Ausrichtungswerkzeug	David Kopf Instruments, Tujunga, CA (1905)
Stimulationsgenerator	Multi- channel Systems, Reutlingen, Germany (STG1004)
Thermomixer comfort	Eppendorf (5355 000.011)
Tip One Filterspitzen 5000 µl 101-1000 µl 200 µl	STARLAB S1053-0718 S1126-7810 S1180-8810

100 µl	S1180-1840
10/20 µl	S1180-3810
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (1703940)
Vortexmischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Vorverstärker	Astro-Med, Inc. West Warwick, RI (P55 A.C)
Waage für Chemikalien	Sartorius (CP124S)
Waage für Mausgewicht	Sartorius (TE 1502S)
Wasserbad Thermo Haake SWB25	Sigma-Aldrich (Z321303)
Werkbank: Thermo Scientific Heraeus	ThermoFisher SCIENTIFIC (51013522)
Zentrifuge	Eppendorf (5417R)

2.1.6 Mikrochirurgische Instrumente

Tabelle 6: Mikrochirurgische Instrumente

Mikrochirurgische Instrumente	Hersteller (Herstellernummer)
Ableitungselektrode	World Precision Instruments (TM33B01KT)
Chirurgische Schere	Fine Science Tools (14130-17)
Dremel	Dremel 3000 (F013300045)
Glaskapillaren	Harvard Appartus (30-0066)
Klammern	Aesculap Surgical Instruments (FB362R)
Pinzette (breit)	Fine Science Tools (11001-12) Aesculap Surgical Instruments (BD965R)
Pinzette (fein)	Fine Science Tools (Dumont #5)
Schere	Fine Science Tools (14060-09)
Schere (fein)	Fine Science Tools (14090-09)
Skalpell (Einweg)	FEATHER (15)
Stimulationselektrode 1. Kohorte	World Precision Instruments (TM33CCINS)
Stimulationselektrode 2. Kohorte	MicroProbes for Life Science (SS-SNEX-100)

2.1.7 Software

Tabelle 7: Software

Software	
Axon pCLAMP 10 Software (Datenaufzeichnungsprogramm und Datenauswertung)	Molecular Devices Systems Analytical Technologies, Union City, CA, USA
GraphPad software Prism 8	La Jolla, CA
MATLAB 2007	Mathworks, Natick, MA

McStimulus Version 2.1.5 for STG1004	Multi Channel Systems MCS GmbH
Excel 16.16.21	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Alle folgenden Experimente wurden durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer FU/1184) und entsprechend der deutschen Vorgaben für Tierversuche durchgeführt. Die Mäuse erhielten wir in insgesamt zwei Kohorten von dem Tierhaus des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin in Göttingen. Für den zeitspezifischen, konditionalen Knockout von *Nlgn2* wurde ein Tamoxifen induzierbares Cre-LoxP-Rekombinationssystem verwendet. Die Herstellung dieser Mauslinie erfolgte durch Dilja Krueger-Burg und Ihre Gruppe in Göttingen.⁵⁷ Nach dem Transport konnten sich die Tiere vor Beginn der Experimente in unserem Institut in Frankfurt mindestens zwei Wochen akklimatisieren. Jedes der Tiere wurde sowohl täglich inspiziert, als auch mit Futter und Wasser ad libitum versorgt. Die Tiere wurden jeweils zu viert in den dafür vorgesehenen Käfigen im Scantainer gehalten und waren einem zwölfstündigen Tag- und Nachtzyklus ausgesetzt. Bei allen folgenden Experimenten bestand kein Wissen über den Genotyp, da dieser zu Beginn verblindet wurde. Bei den *in vivo* Versuchen wurden ausschließlich männliche, adulte Mäuse verwendet, die zwischen 15 und 19 Wochen (103-131 Tage) alt waren. Das mittlere Alter der 67 Mäuse, von denen die Messdaten erhoben wurden, lag bei 17 Wochen (117 Tage).

2.2.2 Beschreibung der konditionalen *Nlgn2*-Knockout

Mauslinie

Zur Herstellung der konditionalen *Nlgn2*-Knockout Mauslinie (Arbeit der Arbeitsgruppe von Dilja Krueger-Burg, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) wurde durch homologe Rekombination⁵⁸ vor und hinter dem Exon 2 des *Nlgn2* Gens, welches das Startcodon beinhaltet, jeweils eine LoxP-Sequenz eingebaut. Zudem enthielt der Targeting-Vektor eine Neomycin-

Kassette, die durch FRT-Sequenzen begrenzt wurde. Durch diese Kassette erhielt der Vektor eine antibiotische Resistenz, sodass Zellen, bei denen der Vektor erfolgreich in das Genom integriert wurde, identifiziert werden konnten. Als nächstes wurde dieses Konstrukt in embryonale Stammzellen des Typs C57BL/6N ES Zellklon JM8A3 eingebracht.⁵⁹ Nachdem die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Einbringung des Targeting-Vektors in die embryonalen Stammzellen bestätigt hatte, wurden diese in Blastozysten injiziert und somit die konditionalen Nlgn2 Knockout Mäuse hergestellt. Im Anschluss wurden die Mäuse mit einer Linie gekreuzt, welche die Rekombinase FLP enthielt, die die FRT-Sequenzen rekombinierte und die Neomycin-Kassette somit entfernte. Die Rückkreuzung zu einem C57BL/6JRj Hintergrund der konditionalen Nlgn2 Knockout Mäuse erfolgte über mindestens sechs Generationen.

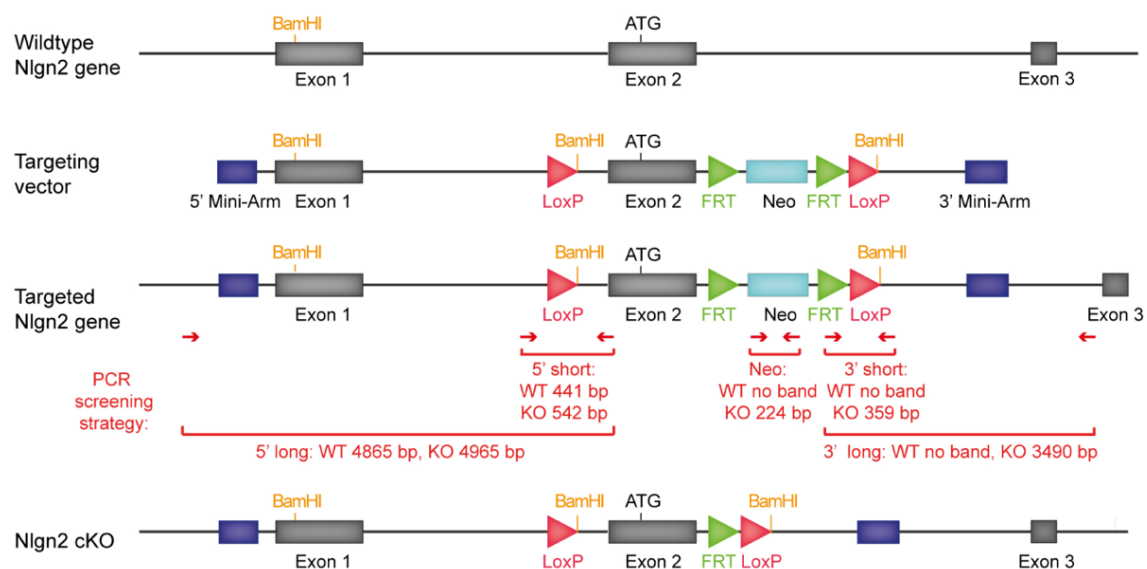


Abbildung 2.1 nach ⁵⁷: Schematische Darstellung der genetischen Basis des konditionalen Nlgn2 Knockouts

In der Abbildung wird die Herstellung der konditionalen Nlgn2 Knockout Mäuse ersichtlich, sowie der Wildtyp des Nlgn2-Gens und der hierfür verwendete Targeting-Vektor.

In einigen Experimenten verglichen Cruces-Solis und Babaev et al. die homozygoten Nlgn2 cKO (FI/FI) Mäuse, mit zwei geflochten Nlgn2 Allelen, mit heterozygoten Nlgn2 cKO (FI/Wt) Mäusen, mit nur einem geflochten Nlgn2 Allel, und Wildtyp Mäusen (Wt/Wt). Hierbei zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen dem Körpergewicht der einzelnen Mäuse, noch im Hinblick auf das Angstverhalten bei verschiedenen Verhaltensexperimenten⁵⁷.

Abbildung 2.2 belegt dies und zeigt außerdem eine gleichbleibende Proteinkonzentration der drei verschiedenen Genotypen in Hippocampus, Amygdala und präfrontalem Cortex.

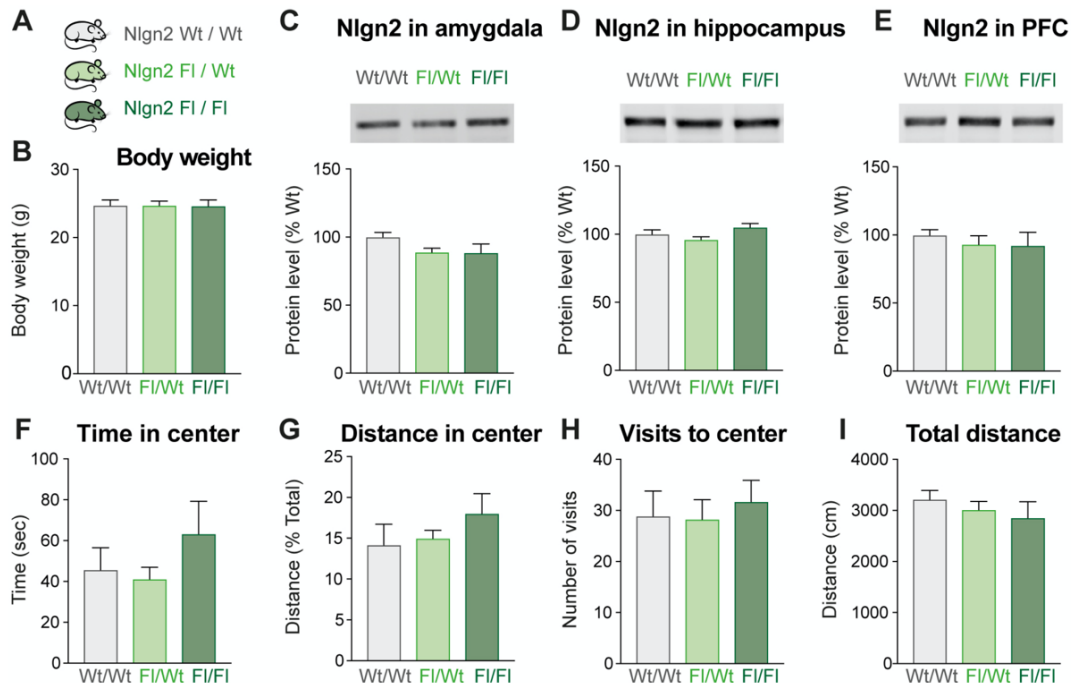


Abbildung 2.2 nach ⁵⁷: Vergleich der konditionalen Nlgn2 KO Mäuse mit dem Wildtyp
Keine signifikanten Unterschiede zwischen den homozygoten (FI/FI) und heterozygoten (FI/Wt) konditionalen Nlgn2 KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp im Bezug auf Körpergewicht, Protein Level in verschiedenen Hirnregionen (Hippocampus, Amygdala und PFC/Präfrontaler Cortex) sowie das Verhalten in angstausslösenden Situationen.

Die Nlgn2 cKO (FI/FI) Mäuse wurden mit einer Linie (ROSA26_CreERT2) gekreuzt, die aus The Jackson Laboratory (JAX stock #008463)⁶⁰ stammte. Eine konditionale CreERT2 Kassetten ist hierbei an der Rosa26 Position vorzufinden, sodass es sich in unseren Experimenten nach Tamoxifen Applikation um einen globalen Knockout handelt, da diese Position in allen Zelltypen und zu allen Entwicklungsstadien transkribiert wird. Bis zur Tamoxifen Behandlung befindet sich der Komplex CreERT2, welcher aus der Cre-Rekombinase (Cre) und einer mutierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER) besteht, im Zytosol. Die Tamoxifengabe ermöglicht die Translokation des Proteinkomplexes CreERT2 in den Nucleus, was zu einer Rekombination der LoxP Sequenzen

durch die Cre-Rekombinase und somit zur Exzision des zweiten Exons des Nlgn2-Gens führt (siehe Abbildung 2.3).⁶¹

2.2.3 Applikation von Tamoxifen per Schlundsonde

Um die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase CreERT2 zu aktivieren und Nlgn2 somit konditional zu eliminieren, wurde den adulten, männlichen Mäusen fünf Tage lang täglich je 200 mg/kgKG Tamoxifen appliziert. Im Alter von acht Wochen, sobald die Mäuse als adult angesehen werden, konnte mit den Applikationen begonnen werden. Die Dosierung des Tamoxifens führt nach Erfahrung von Dilja Krueger-Burg und ihrer Gruppe zu keiner Toxizität. Tamoxifen wurde wegen der geringen Wasserlöslichkeit in Maisöl als Vehikel gelöst. Mithilfe einer Präzisionswaage wurde die exakte Menge des Tamoxifens bestimmt. 20 mg Tamoxifen wurden in einem Milliliter Maisöl gelöst, sodass bei einer Applikationsmenge von 10 ml/kg eine 25 g schwere Maus 0,25 ml des in Tamoxifen gelösten Maisöls erhielt. Der Prozess des Lösens von Tamoxifen dauerte bei Raumtemperatur fünf bis zehn Stunden und erfolgte in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen, welches an einem Rotator (Rotamix) befestigt über Kopf 360 Grad gedreht wurde. Sowohl das Maisöl als auch das Tamoxifen sind lichtempfindlich, weshalb beide Substanzen im Dunkeln gelagert wurden und bei der Rotation mit Aluminiumfolie bedeckt waren. Tamoxifen in Maisöl-Vehikel wurde drei Tage bei Raumtemperatur gelagert, jedoch nicht kühler, da Tamoxifen bei 4° C ausfällt. Zur Applikation wurden jeweils 1 ml Spritzen verwendet, sodass die gewichtsadaptierte Menge möglichst akkurat appliziert werden konnte. Des Weiteren wurden Metallschlundsonden verwendet, die auf der Spritze befestigt wurden und so die orale Eingabe von Tamoxifen in Maisöl-Vehikel ermöglichten. Vor Applikation wurde die Spritze entlüftet und die Magensonde von Öls Spuren befreit. Zwei der drei Kontrollgruppen erhielten das mit einer zweiten Metallschlundsonde der gleichen Art verabreichte Maisöl-Vehikel der gleichen Menge, jedoch ohne Tamoxifen Zugabe. Da sich in diesem Arbeitsschritt die vier Gruppen formierten, sind diese im Folgenden aufgelistet.

Experimentalgruppe: cNlgn2 FI/FI, ROSA26_CreERT2 hom, Tamoxifen in Maisöl-Vehikel (**homT**)

Kontrollgruppe 1: cNlgn2 FI/FI, ROSA26_CreERT2 hom, Maisöl-Vehikel (**homV**)

Kontrollgruppe 2: cNlgn2 FI/FI, ROSA26_CreERT2 wt, Tamoxifen in Maisöl-Vehikel (**wtT**)

Kontrollgruppe 3: cNlgn2 FI/FI, ROSA26_CreERT2 wt, Maisöl-Vehikel (**wtV**)

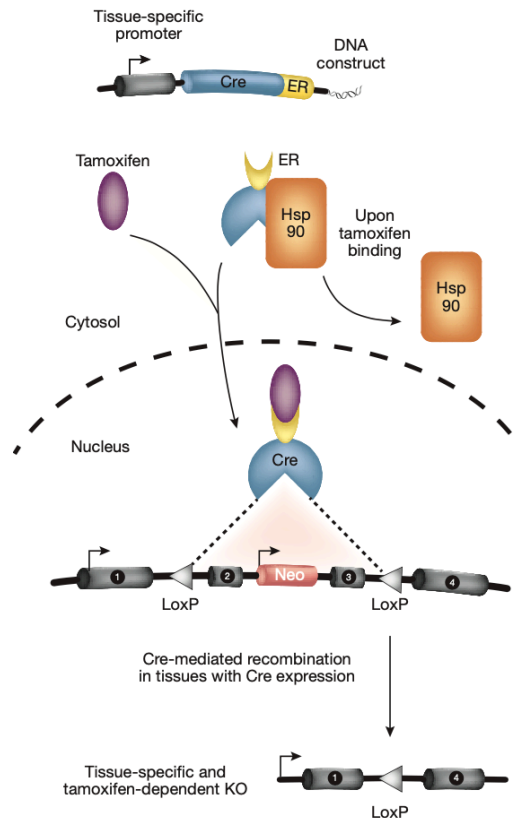


Abbildung 2.3 modifiziert nach⁶²: Tamoxifen induzierter konditionaler Knockout

Durch die Tamoxifen-Applikation wird das Cre-loxP System induziert, jedoch ohne die auf der Abbildung dargestellte gewebespezifische Komponente. Der mit der Cre-Rekombinase (Cre) fusionierte Östrogenrezeptor (ER) bindet an das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) und verbleibt hierdurch im Zytosol. Nach Tamoxifen-Applikation bindet Tamoxifen anstelle des Hsp90 an den Östrogenrezeptor, sodass eine Translokation in den Nucleus stattfinden kann. Im Nucleus exzidiert die Cre-Rekombinase mittels Rekombination der loxP Sequenzen das gefloxt Gen.

Im Anschluss an den letzten der fünf Applikationstage wurde sechs Wochen abgewartet, um die Proteinlevel in den Mäusen ausreichend zu senken. Diese sechs Wochen Wartezeit basierten auf unpublizierten Experimenten von Dilja Krueger Burg und ihrer Gruppe, die Proteinlevel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation in verschiedenen Hirnregionen gemessen haben. Nach vier Wochen zeigten sich keine Änderungen der Nlgn2

Proteinkonzentrationen im Westernblot. Trotz des erreichten Plateaus nach vier Wochen warteten wir sicherheitshalber insgesamt sechs Wochen nach Applikation⁵⁷, da Liang et al. bereits 2015 beschrieben haben, dass der elektrophysiologische Effekt des konditionalen Nlgn2 Knockouts im Cortex erst sechs bis sieben Wochen nach Nlgn2 Inaktivierung auftritt.⁶³ Zur Verifizierung des erfolgreichen konditionalen Nlgn2 Knockouts bestimmten wir nicht nur lokal im Hippocampus die Proteinreduktion, sondern ließen in Göttingen die Reduktion von Nlgn2 auf Genom-Ebene untersuchen.⁵⁷ Die PCR-Ergebnisse der vier Gruppen normalisierten wir anhand des Mittelwertes der dritten Kontrollgruppe (cNlgn2 Fl/Fl, ROSA26_CreERT2 wt, Maisöl-Vehikel). Im Anschluss erfolgte die statistische Auswertung (siehe 2.2.9).

2.2.4 Narkoseeinleitung

Am Tag vor dem elektrophysiologischen Versuch wurde die Maus in einen separaten Käfig zur Akklimatisierung gesetzt. Außerdem wurde die Maus vor Beginn der Narkose mindestens fünfzehn Minuten lang auf einer Heizmatte am Ort der Narkoseeinleitung platziert, was erneut der Akklimatisierung diene. Für die stereotaktische Chirurgie wurden die Mäuse zunächst in eine tiefe Narkose gesetzt. Dies erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von 1,25 g pro kg Körpergewicht Urethan, welches in 0,9%-NaCl (Natriumchlorid) Lösung aufbereitet wurde. Die Narkosetiefe wurde durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes nach Narkoseeinleitung und während der stereotaktischen Chirurgie in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Je nach Reflexstatus wurden weitere subkutane Dosen von Urethan appliziert (jeweils 0,125 g/kg KG, in der Regel: 0,01-0,03 ml). Des Weiteren wurde initial sowie erneut nach zwei Stunden 0,5 mg/kg Glykopyrroniumbromid (Robinul) subkutan appliziert, um Bronchospasmen zu vermeiden und die Atemwege von Bronchialsekret frei zu halten. Sowohl Urethan, als auch Glykopyrroniumbromid wurden auf mehrere Fettdepots verteilt appliziert. Um die Körpertemperatur stabil zu halten und den Bedarf an Kohlenhydraten auch während des Versuchs zu gewährleisten, wurde bereits 30 Minuten nach Narkoseeinleitung 0,25 ml Normofundin G-5 Infusionslösung intrakutan verabreicht, die zuvor im Wasserbad auf 37°C erhitzt wurde. Nach zwei Stunden konnte erneut 0,15 ml

der Glucoselösung appliziert werden. Sobald sich die Maus nicht mehr bewegte und auch die Reflexe schwächer wurden, konnte mit der stereotaktischen Chirurgie begonnen werden.

2.2.5 Stereotaktische Chirurgie

Nachdem die optimale Narkosetiefe erreicht wurde, konnte die Maus auf einer Heizplatte platziert werden. Die Temperaturkontrolle erfolgte mithilfe einer Rektalsonde und wurde während der gesamten Versuchsreihe nahe 37°C gehalten. Zu Beginn wurde die Maus in ein stereotaktisches Gerät zur Fixierung des Kopfes eingespannt, um Bewegungen während der Ableitung der Feldpotentiale zu verhindern. Die Augen der Maus wurden mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe benetzt, um ein Austrocknen während der Operation zu vermeiden. Die Operationsstelle wurde subkutan mit 0,5 ml Xylonest (1% Prilocainhydrochlorid mit Adrenalin 1:200 000) betäubt. Nach der lokalen Betäubung wurde die Kopfschwarte mithilfe mikrochirurgischer Instrumente entlang der Sagittalnaht eröffnet und die Kopfschwarte im Anschluss mit Klammern zur Seite gespannt. Im Anschluss wurde die Schädeldecke mit Wattestäbchen klar dargestellt und unter dem Operationsmikroskop Bregma (Schnittpunkt zwischen Sagittal- und Koronarnaht) und Lambda (Schnittpunkt zwischen Sagittal- und Lambdanaht) identifiziert und markiert. Nach Eröffnen der Kopfschwarte konnte mithilfe eines Ausrichtungswerkzeuges der Kopf der Maus optimal eingestellt werden. Bei der Kopfeinstellung wurde als erstes die Querachse und danach die Längsachse eingestellt. Mithilfe einer feinen Glaskapillare und des Operationsmikroskops wurde die Bregma-Lambda-Entfernung bestimmt. Die Koordinaten für die Positionierung der Stimulationselektrode (2,5 mm lateral der Sagittallinie und **3,8 mm** okzipital von Bregma) und Ableitungselektrode (1,2 mm lateral der Sagittallinie und **1,7 mm** okzipital von Bregma) basieren auf dem Maushirnatlas von Paxinos und Franklin⁶⁴. Jeweils abhängig von der zuvor gemessenen Bregma-Lambda-Entfernung wurden die Positionen mithilfe einer Korrekturformel, welche sich in der Arbeitsgruppe von Prof. Roeper etabliert und als zuverlässig gezeigt hat, in der sagittalen Achse angepasst:

Stimulationskoordinate p.B.: $(3,8 + 0,3) \times (\text{Bregma-Lambda-Entfernung} / 4,2)$

Ableitungskoordinate p.B.: $(1,7 + 0,3) \times (\text{Bregma-Lambda-Entfernung} / 4,2)$

Anschließend wurden die zwei festgesetzten Koordinaten markiert und mit einem feinen Bohrer zwei kleine Löcher ausgefräst bis jeweils die Dura sichtbar war. Die Dura wurde anschließend mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und das nun freiliegende Hirngewebe mit NaCl und Wattestäbchen von Blutspuren gesäubert. In der Nackenmuskulatur des Tieres wurde die Erdungselektrode befestigt, die eine Referenzspannung lieferte. Die Koordinaten für die Stimulations- und Ableitungselektrode wurden von Bregma ausgehend erneut bestimmt. Zunächst wurde die Stimulationselektrode 1,5 mm (Zieltiefe: 1,5-2,2 mm unter der Hirnoberfläche) und die Ableitungselektrode 0,5 mm (Zieltiefe: 1,7-2,2 mm unter der Hirnoberfläche) unter der Hirnoberfläche senkrecht abwärts bewegt. Mit manuellen Mikromanipulatoren war die exakte Positionierung der konzentrischen, bipolaren Stimulationselektrode im Tractus Perforans und der Ableitungselektrode in der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus möglich. Nach Minimierung des Störsignals wurde bei 500 μA und 0,1 Hz der Tractus perforans stimuliert. Beim langsamen Absenken der Ableitungselektrode in 0,05 - 0,1 mm großen Schritten wurden die evozierten Potenziale des Gyrus Dentatus sichtbar und hörbar. Das Signal veränderte sich in Abhängigkeit von der Ableitungstiefe auf jeweils spezifische Art und Weise.^{26,65} Beim Erreichen der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus wurde dann ein breites exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential (fEPSP) und ein negativer, spitzförmiger Populationsspike sichtbar. Das weitere Absenken der Ableitungselektrode erfolgte in 0,01 mm großen Schritten bis ein maximales fEPSP erreicht wurde. Da die Stimulationselektrode, welche von Jedlicka et al. in Nlgn2 KO Mäusen verwendet wurde, nicht mehr produziert wird, mussten wir auf vergleichbare Stimulationselektroden (siehe Kapitel 2.1.6) zurückgreifen.⁴⁹ Insgesamt erhielten wir aus Göttingen zwei Kohorten von Mäusen, für die wir im Verlauf der elektrophysiologischen Experimente jeweils zwei unterschiedliche Stimulationselektroden verwendeten. Wir gingen von passenderen Eigenschaften der zweiten Stimulationselektrode (SS-SNEX-100 von MicroProbes for Life Science) aus, da sich diese beispielsweise für das PPF-Protokoll und die Baseline Suche für die LTP-Messungen besser geeignet zeigte und auch die Input/Output-Funktion insgesamt bei geringerer Stimulationsstärke höhere Antworten der Ableitung verzeichnete.

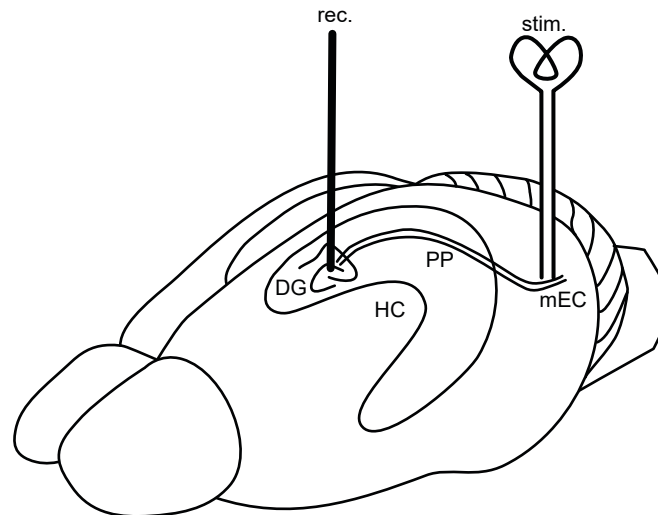


Abbildung 2.4 modifiziert nach⁶⁶: Schematische Darstellung der Elektrodenposition
 Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Elektrodenposition im Hippocampus (HC) sowie medialen entorhinalen Cortex (mEC). Stimuliert (stim.) wird der Tractus Perforans (PP) im medialen entorhinalen Cortex bei gleichzeitiger Ableitung (rec.) der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus (DG) im Hippocampus. Die Ableitungselektrode (Rec) ist zunächst im Stratum moleculare des Gyrus Dentatus positioniert und wird dann langsam Richtung Körnerzellschicht in die Tiefe fortbewegt.

2.2.6 Ableitung der Feldpotentiale

Die Stromimpulse, die zur Stimulation des Tractus Perforans benötigt wurden, konnten mithilfe eines Stimulus-Generators erzeugt werden. Die evozierten lokalen Feldpotentiale aus der Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus wurden zunächst mithilfe eines Vorverstärkers verstärkt und die hieraus generierten Daten von einem Computer über einen zwischengeschalteten Analog-Digital-Signalwandler empfangen. Für die Datenaufzeichnung sowie erste Datenauswertung wurde das Programm Clampfit 10.2 benutzt. Um die evozierten Potentiale aus der Körnerzellschicht nicht nur sichtbar, sondern auch hörbar zu machen, wurde ein Lautsprecher verwendet. Um die Erregbarkeit der Körnerzellschicht zu quantifizieren, wurde zunächst die Input/Output-Funktion gemessen. Dazu wurden bei steigender Stimulationsintensität (30-800 μ A, 0,1 ms Stimulusdauer) Einzelstromimpulse abgegeben und die Antwort der Körnerzellen aufgenommen. Bei den sich anschließenden Doppelpuls-Fazilitierungsmessungen (Paired-Pulse Facilitation, PPF) wurde bei insgesamt sechs aufeinanderfolgenden Doppelpulsen das Zeitintervall zwischen diesen

Doppelpulsen (= Interpulsintervall, IPI) stetig von 15 auf 100 ms vergrößert und dabei die fEPSP Antwort der Körnerzellen gemessen. Die Stimulationsintensität der Pulse mit einer Stimulusdauer von 0,2 ms wurde unterschwellig gewählt, sodass keiner der beiden Doppelpulse einen Populationsspike auslösen konnte und die zweite fEPSP Antwort größer als die erste Antwort ausfiel. Dieses Messprotokoll diente der Prüfung der präsynaptischen Funktion sowie Kurzzeitplastizität der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse. Zur Funktionsprüfung der GABAergen Netzwerkinhibition wurde ein Paired-Pulse Inhibition (PPI) Protokoll angewandt, welches aus 13 Doppelpulsen mit pro Doppelpuls jeweils größer werdenden Interpulsintervallen (20-1000 ms) bestand. Hierbei wurde die maximale Stimulationsstärke von 800 μ A (0,2 ms Stimulusdauer) verwendet, um die maximale Anzahl der Körnerzellen zu aktivieren und somit den größtmöglichen Populationsspike zu messen. Zudem wurde bei einer geringeren n-Zahl an Tieren ein zweites PPI Protokoll durchgeführt, bei dem die Stromstärke so gewählt wurde, dass ein minimaler, ungefähr 1 mV großer Populationsspike sichtbar war. Bevor das LTP-Protokoll als Maß für die synaptische Plastizität an der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse induziert werden konnte, musste eine optimale Baseline gesucht werden. Der Populationsspike sollte hierbei 0,5 bis 1,5 mV groß und die Slope möglichst stabil sein. Die erste Baseline wurde für insgesamt zehn Minuten bei 0,1 Hz und 0,1 ms Stimulusdauer aufgenommen. Anschließend wurde durch eine hochfrequente Theta Burst Stimulation (TBS) LTP induziert. Diese TBS-Stimulation, welche mit einer verdoppelten Stromstärke im Vergleich zur Baseline durchgeführt wird, setzte sich aus sechs Wiederholungen von sechs Abfolgen mit sechs 0,2 ms andauernden Stimulationspulsen bei 400 Hz zusammen. Zwischen den Abfolgen liegen 200 ms und zwischen den sechs Wiederholungen 20 Sekunden. Zuletzt wurde eine zweite Baseline bei 0,1 Hz für 60 Minuten gemessen. Wenn die Amplitude des fEPSPs größer als 3 mV und bei 400 μ A ein Populationsspike sichtbar war, konnte die Aufnahme in die Auswertung miteinbezogen werden. Ein letztes Protokoll sollte die Frequenzschwelle bestimmen, ab der man mehrfache epilepsieähnliche Entladungen (Multiple Spike Discharges) der Körnerzellen induzieren kann. Dazu wurde der Tractus Perforans mit steigender Stimulusfrequenz (0,5-5 Hz, 0,1 ms Stimulusdauer) jeweils eine Minute maximal (800 μ A) stimuliert. Nach dem Messen dieser

Multiple Spike Discharges wurde die tief narkotisierte Maus getötet und die Hippocampi und Schwanzspitzen für weitere Experimente konserviert.

2.2.7 Analyse der elektrophysiologischen Daten

Für die Analyse der elektrophysiologischen Daten wurden die Software Programme pClamp, Matlab, und Excel benutzt. Bei der Analyse der Input/Output Funktion wurden jeweils drei Durchläufe pro Stromstärke gemittelt und sowohl die Amplitude des Populationsspikes, als auch die fEPSP slope (Steigung) gegen die Stimulationsstärke geplottet. Auch bei der PPF Analyse wurden die drei Dateien der gleichen Stimulationsstärke zunächst gemittelt, bevor für jedes IPI das Verhältnis von der zweiten fEPSP Amplitude zur ersten fEPSP Amplitude bestimmt wurde. Hier wurden jeweils nur erfolgreiche PPF Messungen miteinbezogen, die als solche definiert wurden, dass bei einem IPI von 15 ms ein minimaler Anstieg der fEPSP Amplitude von 110% sichtbar war. Nach Mittelung der PPI Daten wurde auch hier bei jedem IPI die relative Veränderung der zweiten Populationsspike Amplitude im Verhältnis zur ersten Amplitude pro Doppelpuls analysiert. Einzelne Ausreißer, die einen prozentualen Anstieg dieses Verhältnis über 300% im Falle der maximalen, 1000% bei der minimalen Stimulation zeigten, wurden als Messfehler betrachtet und verworfen. Das mittlere IPI, bei dem die zwei Doppelpulse eine gleiche Amplitudengröße des Populationsspikes auslösen, wurde durch Anpassen der PPI-Kurven mithilfe einer Boltzmann Funktion bestimmt.⁴⁹ Bei der Analyse von LTP-Messungen wurde auf Veränderungen der Amplitude des Populationsspikes sowie Änderungen der Slope des fEPSP nach TBS-Stimulation geachtet. Es wurden lediglich Messungen verwertet, die in der 2. Minute nach LTP-Induktion einen Anstieg auf mindestens 110% vor LTP-Induktion zeigten. Instabile LTP-Messungen (<90% in 60.Minute) wurden verworfen. Im Anschluss wurden die ersten sowie letzten zehn Minuten nach TBS-Induktion pro Tier gemittelt und diese Werte pro Gruppe statistisch verglichen (siehe Kapitel 2.2.9). Die Daten der ersten und zweiten Kohorte (siehe Kapitel 2.2.5) wurden vor dem Poolen und der statistischen Auswertung jeweils pro Stimulationsstärke verglichen (t-test / Mann-Whitney Test). Zeigten sich hier zwischen den Kohorten statistisch signifikante Unterschiede, erfolgte die weitere Auswertung des jeweiligen

Messprotokolls der ersten und zweiten Kohorte separat. Bei dem PPF Protokoll wurden nur die Daten der zweiten Kohorte verwertet, da sich die PPF-Induzierung in der ersten Kohorte als problematisch darstellte.

2.2.8 Proteinanalyse von Neuroligin 2

2.2.8.1 Entnahme des Hippocampus

Nach Dekapitation wurde der Kopf der Maus in einer Petrischale unter einer reinen Werkbank zur weiteren Präparation platziert. Zunächst wurde sowohl Kopfhaut, als auch Schädeldecke durch einen sagittalen Schnitt von kaudal nach rostral mithilfe einer kleinen Schere durchtrennt. Eine starke Pinzette und zwei Spatel waren nun notwendig, um die Schädeldecke aufzuspalten und das Mausgehirn vorsichtig zu entnehmen. Anschließend wurde ein Skalpell benötigt, um das Cerebellum vom Gehirn abzuschneiden und beide Hirnhälften in der Sagittallinie zu durchtrennen. Die weitere Präparation des Hippocampus erfolgte mithilfe der Spatel unter Sicht durch das STEMI 2000 Zeiss Mikroskop. Das Mausgehirn wurde mit der medialen Seite nach oben platziert und das Diencephalon entfernt, welches den Hippocampus bedeckte. Die typische bananenförmige Struktur des Hippocampus wurde nach diesem Prozedere sichtbar, sodass dieser vorsichtig vom Cortex separiert werden konnte. Anschließend wurde jeder der zwei zuvor präparierten Hippocampi in Mikroreaktionsgefäßen auf Trockeneis platziert und bis zur weiteren Verwertung bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Probenvorbereitung und Proteinquantifizierung

Bevor es zur Denaturierung der Proben durch Erhitzung kam, wurden die Proben stets auf Eis gelagert. Anschließend wurde in das Mikroreaktionsgefäß mit der jeweils rechten oder linken Hippocampushälfte 100 µl Homogenisierungspuffer hinzugegeben. Darauffolgend wurde das Gewebe homogenisiert und bei 4°C insgesamt 30 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl (13.000 rpm / 17900 rcf) pro Minute zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand in neue Mikroreaktionsgefäße übergeführt und das Sediment verworfen. Vor der Quantifizierung der Proteine wurden 5 µl der Probe in einem neuen

Mikroreaktionsgefäß mit 10 µl des Homogenisierungspuffers verdünnt. Die Proteinquantifizierung erfolgte nach Anleitung des Quant-iT Protein Assay Kit. Hierzu wurden 1 µl der bis dahin verdünnten Proben auf 0,5 ml Mikroreaktionsgefäße verteilt und mit 199 µl der Quant IT working solution versetzt. Pro Mikroreaktionsgefäß wurden jeweils 10 µl der Standard Lösung C, D oder E zugegeben und diese dreimal mit 190 µl Qant IT working solution aufgefüllt. Nach Reaktionsmischung durch einen Vortexmischer wurden die Mikroreaktionsgefäße für 15 Minuten im Dunkeln gelagert. Anschließend erfolgte eine Kalibrierung des Fluorometer Qubit mithilfe der Standards und die Proteinmessung in mg/ml.

2.2.8.3 Proteinvorbereitung

Insgesamt wurden pro Tasche jeweils 20 µg/ul Protein aufgetragen. Die Proben, von denen die Proteinkonzentration nach Quantifizierung bekannt war, wurden auf 15 µl mit dem Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Bei 95°C wurden die Proben für fünf Minuten im Thermomixer comfort gekocht und die Proteine dadurch denaturiert. Um unspezifische Reaktionen zu verhindern, wurden die Proben im Anschluss auf Eis gelagert und vor dem Probenauftrag kurz zentrifugiert. Das von Laemmli entwickelte Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem enthält das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat).⁵⁶ Durch das Erhitzen der Proben mit SDS werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst und die Proteine linearisiert. Zudem kann die Molmasse der Proteine nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestimmt werden, dadurch dass SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt und somit SDS-Micellen mit ca. 1,4 g SDS pro Protein entstehen. Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol wurde dem Laemmlipuffer zugesetzt, um die Schwefelbrücken zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren, den Cysteinen, aufzuspalten.⁶⁷

2.2.8.4 SDS-PAGE

Die nach Laemmli entwickelte Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglichte uns die Trennung der Proteine nach

ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld.⁵⁶ Das Gel aus Polyacrylamidbasis bestand aus zwei Anteilen, einem Sammelgel und einem Trenngel (Zusammensetzung siehe Material). Bei Zugabe des Katalysators TEMED und des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) wurde zunächst die Polymerisation des unteren Gels (Trenngel) in Gang gesetzt. Nach dem Gießen der Trenngellösung in die Gekassette und vollständiger Polymerisierung wurde das untere Gel mit der Sammelgellösung benetzt. Der Probenkamm, der zur Herstellung der Taschen für den Probenauftrag dient, wurde anschließend luftblasenfrei eingesetzt und bis zur endgültigen Polymerisierung im Gel belassen. In der Elektrophoresekammer befand sich der Elektrophoresepuffer, in den wiederum das Polyacrylamid-Gel eingespannt wurde. In die erste Tasche des Gels wurde ein Größenmarker für die Proteinmasse (Precision Plus Protein Dual Color) gegeben, der aus Proteinen bekannter Größe bestand. Die einzelnen Proben wurden mit einer Hamiltonspritze nacheinander in die einzelnen Taschen des Gels pipettiert. Bei der sich anschließenden Gelelektrophorese wurden die Proteine zunächst im Sammelgel mit neutralem pH konzentriert. Im basischen Trenngel wurden die SDS-Proteinkomplexe dann nach ihrer Größe aufgetrennt, da kleinere Proteine schneller als größere wandern. Durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung) erscheint Neurologin 2 (Masse: 90 989 Da) bei ungefähr 105 kDa.^{45,68} Bis die Proben das Trenngel erreicht haben, wurde zur Vorfokussierung im Sammelgel eine geringere Spannung von 80 V angelegt, die später auf 120 V erhöht wurde.

2.2.8.5 Western-Blotting

Die Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Polyacrylamidgel auf eine aus Nitrozellulose bestehende Blotmembran übertragen. Um dieses Semidry-Blotting durchzuführen, wurden zwei Filtermembranen zunächst auf die gleiche Größe der Nitrozellulose-Membran geschnitten und gemeinsam im Transferpuffer für 10 Minuten getränkt. Nun wurden von oben nach unten das Filterpapier, das Polyacrylamidgel, die Nitrocellulose Membran und das zweite Filterpapier zu einem Sandwich auf der Anode zwischen den Plattenelektroden gestapelt. Luftblasen wurden durch Rollen eines Glasstabs über den Western-Blotting Sandwich vermieden. Der

Transfer auf die Membran dauerte 75 Minuten bei einer Spannung von 15 mV. Nach erfolgreichem Transfer, den man durch Übertragung des farbigen Größenmarkers auf die Nitrozellulose-Membran beurteilen konnte, wurde lediglich die Nitrozellulose-Blottingmembran in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen konserviert.⁶⁷

Dann erfolgten drei Waschschrte mit TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an der Membran bei der Immundetektion zu verhindern, wurden die freien Stellen für eine Proteinbindung mit Blockierungspuffer versetzt. Bei Raumtemperatur wurde die Membran in dieser Lösung für zwei Stunden auf einem Schüttler belassen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, der 1:1000 verdünnt wurde (Verdünnungspuffer siehe Material), über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Reihenfolge, Inkubationszeit und jeweilige Verdünnung mit dem Verdünnungspuffer für Antikörper der verwendeten Antikörper kann der Tabelle 4 entnommen werden. Zwischen den einzelnen Antikörpern erfolgten jeweils drei Waschschrte mit TBS-T-Puffer für je 10 Minuten.

2.2.8.6 Analyse der Western-Blotting Daten

Um die Fluoreszenz der sekundären Antikörper zu detektieren, wurde ein Li-Cor Infrarot Scanner verwendet und die Western-Blotting Daten mithilfe der Bildverarbeitungssoftware Image Studio Lite Ver. 5.2. quantifiziert. Die Banden wurden gegen das Haushaltsprotein GAPDH normalisiert (Signalintensität von Neuroligin2 / Signalintensität von GAPDH) und aus diesem Quotienten der Mittelwert von beiden Hippocampi gebildet. Mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe 3 (cNlgn2 FI/FI, RSCERT wt, Maisöl-Vehikel) wurde dann jeder Wert pro Maus normalisiert. Bevor die Werte des rechten und linken Hippocampus gemittelt wurden, konnte durch Anwendung eines Wilcoxon matched-pairs signed rank test (keine Normalverteilung laut Shapiro-Wilk Test) gezeigt werden, dass zwischen den zwei Hippocampi pro Tier kein signifikanter Unterschied bezüglich der Proteinmenge besteht.

2.2.9 Statistik

Vor Durchführung der Experimente erfolgte eine Fallzahlberechnung, welche dem Tierversuchsantrag beigelegt wurde. Die erhobenen Western-Blotting Daten, die Daten der extern durchgeführten Genotypisierung und die analysierten elektrophysiologischen Daten wurden mit GraphPad Prism8 statistisch ausgewertet. Um die korrekte Zuordnung der einzelnen Ergebnisse zu gewährleisten, wurde die Versuchsperson nach Analyse der Daten entblindet. Graphisch sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei $P < 0,05$ festgesetzt. Die statistische Testung auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk Tests. Normalverteilte Daten der vier Gruppen wurden pro Stimulationsstärke mithilfe des Ordinary one-way ANOVA Tests verglichen und für multiples Testen durch Hinzuziehen des Tukey Tests korrigiert. Bei Daten, die von einer Normalverteilung abwichen, wurden pro Stimulationsstärke die vier Gruppen mittels Kruskal-Wallis Test verglichen. Anschließend wurden diese Ergebnisse ebenso für multiples Testen durch Anwendung des Dunn's Test korrigiert.

3 Ergebnisse

3.1 Signifikante Reduktion von Nlgn2 auf Genom- und Proteinebene

Um die Effizienz des Tamoxifen induzierten konditionalen Nlgn2 Knockouts in der Experimentalgruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu belegen, untersuchten wir *post mortem* die Nlgn2 Reduktion sowohl auf Genom- als auch auf Proteinebene. Die Genotypisierung mittels konservierter Schwanzspitzen wurde von Dilja Krueger-Burg und ihrer Arbeitsgruppe in Göttingen durchgeführt. Die von Fritz Benseler entwickelte PCR-Methode ist der Publizierung Crucesolis und Babaev et al. zu entnehmen.⁵⁷ Die Ergebnisse wurden anhand des Mittelwertes der Kontrollgruppe 3 (cNlgn2 Fl/Fl, ROSA26_CreERT2 wt, Maisöl-Vehikel; wtV) normalisiert und sind graphisch in der Abbildung 3.1 dargestellt. Wie bereits im Methoden-Teil erklärt, handelt es sich bei dem konditionalen Knockout um einen zeitspezifischen jedoch ortsunspezifischen Knockout. Folglich weist die Genotypisierung der Schwanzspitzen auf eine globale Reduktion von Nlgn2 auf Genomebene hin. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Tamoxifen induzierte konditionale Knockout in den behandelten Tieren erfolgreich durchgeführt werden konnte und sich in der Experimentalgruppe eine signifikante Reduktion von Nlgn2 auf Genomebene abzeichnet ($P < 0,0002$). Der Standardfehler (SEM) der Experimentalgruppe (homT n = 16) kann mit 0,01375%, der Kontrollgruppe 1 (homV n = 13) mit 0,002174%, der Kontrollgruppe 2 (wtT n = 18) mit 0,03421% und der Kontrollgruppe 3 (wtV n = 14) mit 0,02606% angegeben werden.

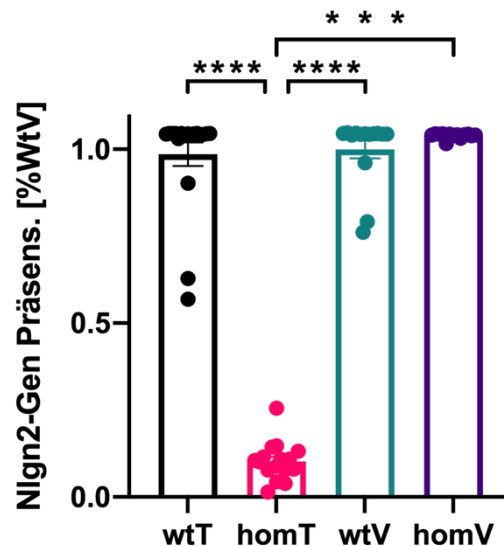


Abbildung 3.1: Genotypisierung der Schwanzspitzen zeigt eine signifikante Reduktion von Nlgn2 nach Tamoxifen Behandlung in Cre-homozygoten Tieren

Die Ergebnisse zeigen eine starke Reduktion des Nlgn2 Gens in den mit Tamoxifen behandelten Cre-homozygoten konditionale KO Mäusen (*homT* $n = 16$) im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($P < 0,0001$ *wtT* und *wtV* vs. *homT*; $P = 0,0002$ *homV* vs. *homT*). Die x-Achse zeigt den jeweiligen Genotyp und die y-Achse, die anhand des Mittelwertes der *wtV*-Gruppe normalisierte Nlgn2-Gen Präsenz in % (*wtT* $n = 18$, *wtV* $n = 14$, *homV* $n = 13$).

Neben den Schwanzspitzen konservierten wir außerdem die Hippocampi der Mäuse, sodass wir nach Mittelung des Protein Level des rechten und linken Hippocampus (siehe Kapitel 2.2.8.6) diese Ergebnisse unter Zuhilfenahme des Mittelwertes der Kontrollgruppe 3 (*wtV*) normalisierten. Mit Tamoxifen behandelte Cre-homozygote konditionale Nlgn2 KO Mäuse zeigten ein signifikant reduziertes Protein Level im Hippocampus mit einer Reduktion auf 41,07% im Vergleich zur Kontrollgruppe 3 (*wtV*) ($P < 0,05$). Abbildung 3.2 stellt dies graphisch dar. Der Standardfehler (SEM) der Experimentalgruppe (*homT* $n = 17$) kann mit 0,06039%, der Kontrollgruppe 1 (*homV* $n = 14$) mit 0,1670%, der Kontrollgruppe 2 (*wtT* $n = 19$) mit 0,1599% und der Kontrollgruppe 3 (*wtV* $n = 13$) mit 0,1844% angegeben werden.

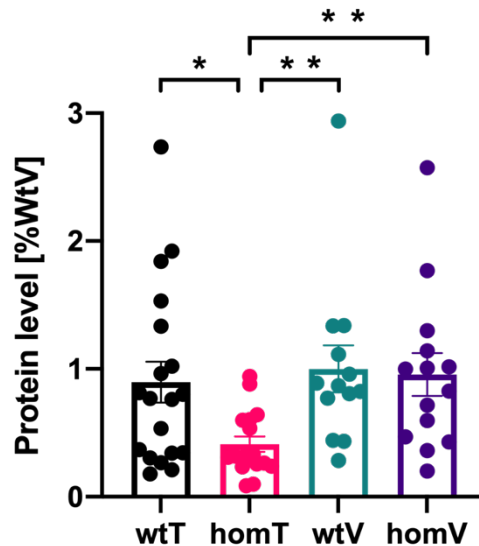


Abbildung 3.2: Reduktion der Proteinkonzentration von Nlgn2 in Hippocampi von konditionalen KO Mäusen

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion des Nlgn2 Protein Levels in den mit Tamoxifen behandelten Cre-homozygoten konditionalen KO Mäusen (homT n = 17) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (wtT n = 19, wtV n = 13, homV n = 14; P = 0,0332 wtT vs. homT; P = 0,0035 wtV vs. homT; P = 0,0068 homV vs. homT). Im Vergleich zur wtV-Gruppe, anhand deren Mittelwertes die Normalisierung des Protein Levels erfolgte, zeigt sich eine Reduktion des Nlgn2 Protein Levels auf 41,07% in der Experimentalgruppe.

3.2 Keine signifikant veränderte Erregbarkeit der Körnerzellen in adulten Nlgn2 cKO Mäusen

3.2.1 Input / Output – Messungen des Populationsspikes

Ab einer bestimmten Schwelle wird ein Neuron erregt, indem ein Output Signal (Aktionspotential) durch ein exzitatorisches Input Signal (EPSP= excitatory postsynaptic potential) generiert wird.⁶⁹ Mithilfe elektrophysiologischer Messungen kann man die Effektivität der synaptischen Transmitterausschüttung an exzitatorischen Tractus Perforans-Körnerzell Synapsen und somit deren Input-Output-Verhältnis untersuchen. Im Hippocampus spiegeln extrazellulär gemessene fEPSPs (field excitatory postsynaptic potentials) die Summe der postsynaptischen Potentiale an den aktivierten Tractus Perforans-Körnerzell Synapsen wieder und tragen maßgeblich dazu bei, dass postsynaptisch mit höherer Wahrscheinlichkeit ein Aktionspotential ausgelöst wird. Der

Populationsspike entspricht der extrazellulär gemessenen Summe von Aktionspotentialen, die durch eine Population von Neuronen ausgelöst werden und ist damit ein Maß für die Erregbarkeit der Körnerzellen. Die Amplitude des Populationsspikes repräsentiert folglich die Anzahl und Synchronizität der feuernenden Körnerzellen.²⁶ Mithilfe der Input/Output-Funktion des Populationsspikes (siehe Abbildungen 3.3 und 3.4) lässt sich feststellen, dass die Erregbarkeit der Körnerzellen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen nach Tamoxifen Behandlung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu jeder der drei Kontrollgruppen aufweist. Dies konnte in zwei Kohorten von Mäusen gezeigt werden (siehe Kapitel 2.2.5). Wenn man die Experimentalgruppe der zweiten Kohorte lediglich mit der 3. Kontrollgruppe (wtV) bei der Stimulationsstärke 150 μA sowie 175 μA vergleicht, lassen sich einzelne Signifikanzen festhalten, die jedoch in Zusammenschau der vier Gruppen lediglich als Trend zu interpretieren sind (siehe Diskussion).

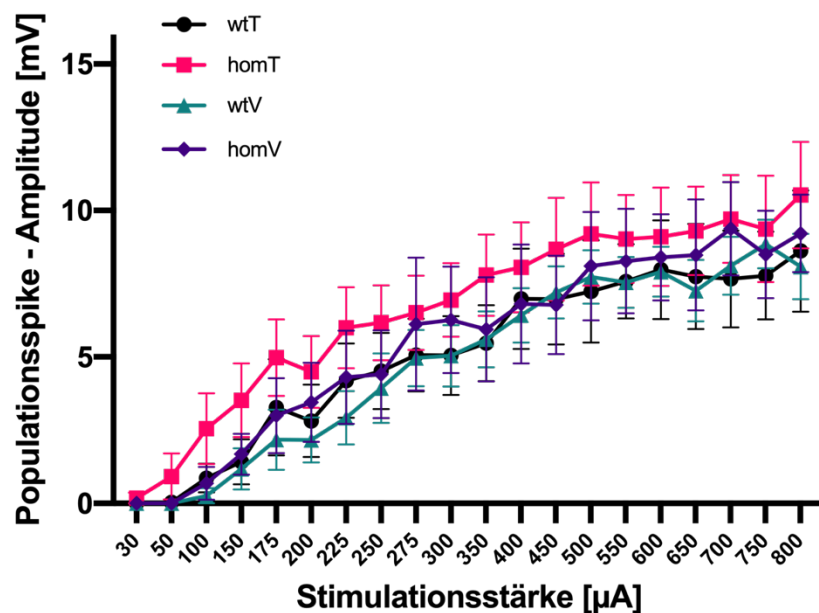


Abbildung 3.3: Input/Output-Funktion des Populationsspikes zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 1)

In der 1. Kohorte lässt sich anhand der Input/Output-Funktion bei konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (homT n = 8) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (wtT n = 7, wtV n = 7, homV n = 7) keine Veränderung der Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus bei Stimulation des Tractus Perforans abzeichnen. Auf der x-Achse ist die Stimulationsstärke (30-800 μA) gegen die Amplitude des Populationsspikes, die Antwort der Körnerzellen auf Einzelstromimpulse, aufgetragen (mV).

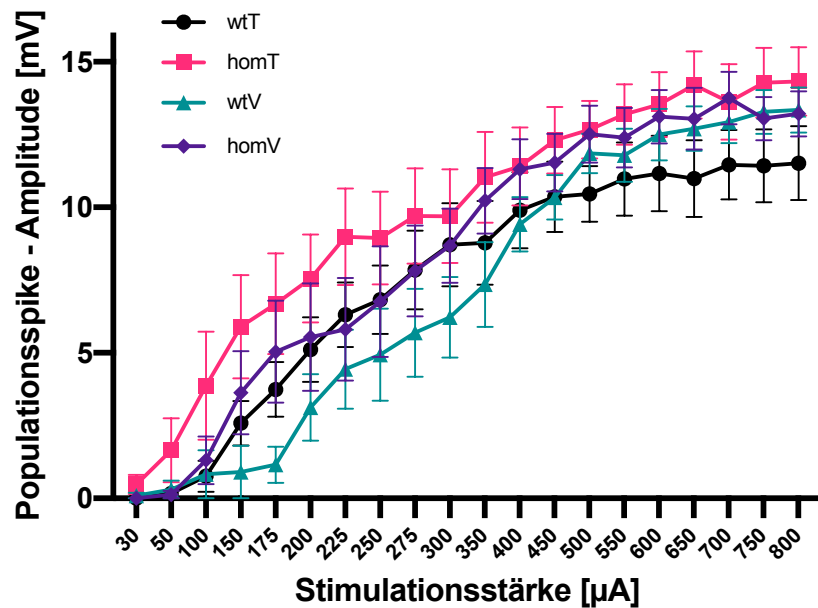


Abbildung 3.4: Input/Output-Funktion des Populationsspikes zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 2)

Die 2. Kohorte zeigt insgesamt einen Trend zu größeren Amplituden des Populationsspikes (y-Achse, mV) bei gleicher Stimulationsstärke (30-800 μV) im Vergleich zur 1. Kohorte. Auch diese Graphik belegt, dass die Input/Output-Funktion der Populationsspike Amplitude bei konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (homT $n = 9$) keine signifikante Veränderung gegenüber den drei Kontrollgruppen aufweist (wtT $n = 11$, wtV $n = 9$, homV $n = 9$). Gegenüber einer der Kontrollgruppen (WtV) zeigt sich eine signifikant erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus bei Stimulation des Tractus Perforans mit 150 und 175 μA (* $P = 0,0146$ bei 150 μA , * $P = 0,0432$ bei 175 μA).

3.2.2 Multiple Spike Discharges

Um die Netzwerkaktivität und Erregbarkeit der Körnerzellen in größerem Umfang zu prüfen, konnte eine epilepsieähnliche Aktivität, sogenannte Multiple Spike Discharges, mithilfe repetitiver Stimulationen bei steigender Frequenz induziert werden. Die Abbildung 3.5. zeigt, dass bei maximaler Stimulation (800 μA) eine bestimmte Stimulusfrequenz notwendig ist, um epilepsieähnliche Aktivität auszulösen. Diese Frequenzschwelle für evozierte Multiple Spikes unterscheidet sich nicht zwischen der Experimental- und den Kontrollgruppen der zwei Kohorten. Dies bestätigt die unveränderte Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

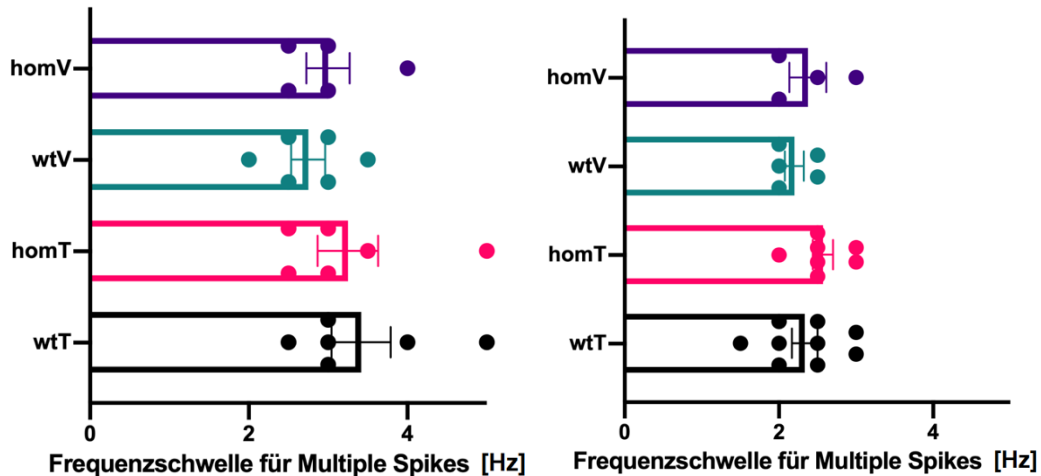


Abbildung 3.5: Epilepsieähnliche Entladungen im Gyrus Dentatus konditionaler Nlgn2 Knockout Mäuse bleiben unverändert

Die Schwelle für die Frequenz, ab der bei maximaler, repetitiver Stimulation des Tractus Perforans sogenannte Multiple Spikes-Entladungen induziert werden können, bleibt in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen unverändert. Dies ließ sich mithilfe der ersten (Abb. links; homT n = 6, homV n = 5, wtT n = 6, wtV n = 6,) sowie zweiten Kohorte (Abb. rechts; homT n = 7, homV n = 4, wtT n = 9, wtV n = 5) zeigen und spricht für eine unveränderte Erregbarkeit der Körnerzellen in Nlgn2 cKO Mäusen.

3.3 Synaptische Transmission im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO Mäuse

Die Slope (Steigung) des fEPSP reflektiert die Stärke und Anzahl der aktivierten Tractus-Perforans-Körnerzell Synapsen und korreliert mit der Amplitude des fEPSP, welches vom nachfolgenden Populationsspike überlagert wird. Somit ist die Slope von der synaptischen Effizienz und damit den beteiligten Neurotransmittern sowie Rezeptoren abhängig.^{26,70} Bei der Messung von evozierten lokalen Feldpotentialen an exzitatorischen Tractus Perforans-Körnerzell Synapsen in adulten, konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen zeigten sich keine Veränderungen der synaptischen Transmission im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen. Dies konnte mithilfe der Input/Output-Funktion bei zwei Kohorten belegt werden (siehe Kapitel 2.2.5). Beim Vergleich der Wildtyp-Kontrollgruppen der zweiten Kohorte untereinander (Wildtyp für Cre-Rekombinase jeweils mit Tamoxifen oder Vehikel behandelt) zeichnete sich bei

einer Stimulationsstärke von 650 und 800 μA eine signifikante Verringerung der fEPSP slope der wtT-Gruppe im Vergleich zur wtV-Gruppe ab (siehe Diskussion).

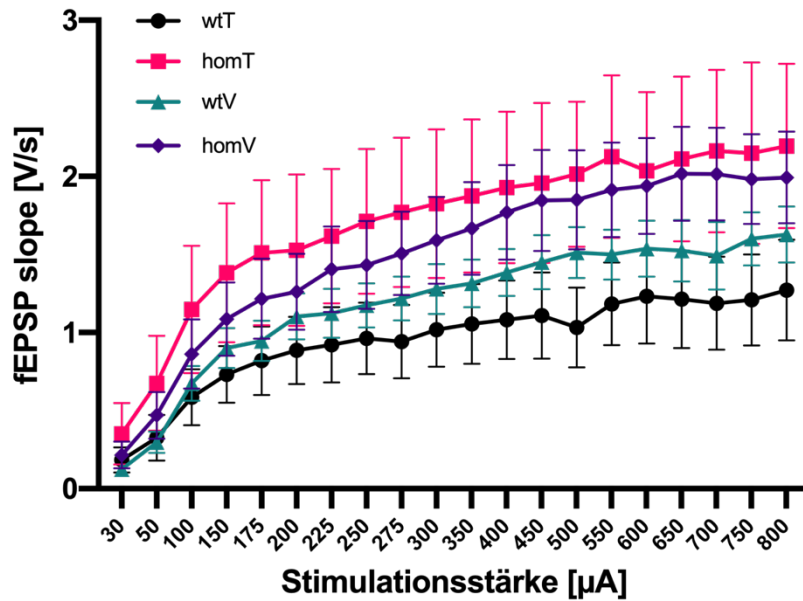


Abbildung 3.6: Input/Output-Funktion der fEPSP slope zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 1)

Bei Stimulation des Tractus Perforans mit steigender Stimulationsstärke (30–800 μV , x-Achse) zeigt sich die fEPSP slope Antwort in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (homT n = 8), als Maß für die synaptische Transmission der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse, unverändert im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen (wtT n = 7, wtV n = 7, homV n = 7).

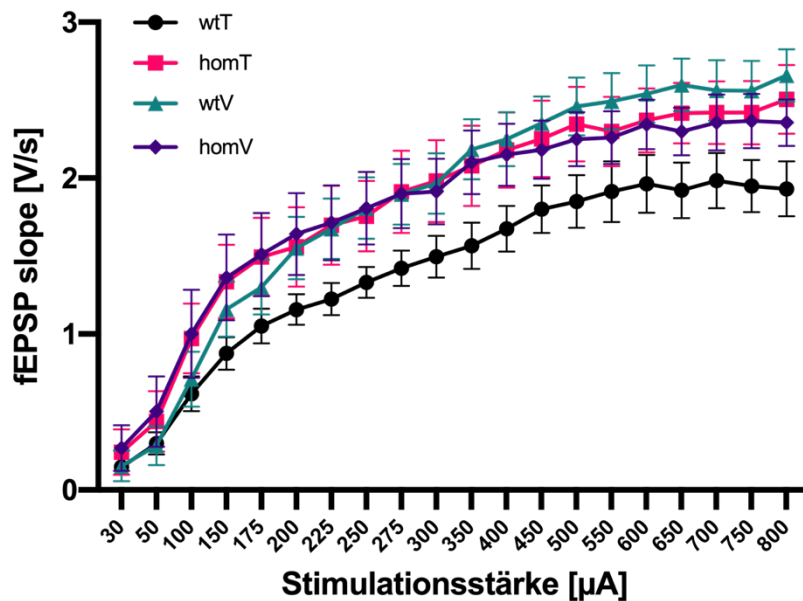


Abbildung 3.7: Input/Output-Funktion der fEPSP slope zeigt keine signifikanten Veränderungen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (Kohorte 2)

*Die zweite Kohorte bestätigt, dass die synaptische Effizienz der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse in Form der Input /Output Funktion der fEPSP slope in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen (homT n = 9) im Vergleich zu den Kontrollgruppen unbeeinflusst bleibt (wtT n = 11, wtV n = 9, homV n = 9). Die WtV-Kontrollgruppe zeigt bei der Stimulationsstärke von 650 und 800 μ A signifikant erhöhte Werte der fEPSP slope im Vergleich zu der mit Tamoxifen behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe, WtT (*P = 0,0411 bei 650 μ A, *P = 0,0290 bei 800 μ A).*

3.4 Plastizität im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO Mäusen

3.4.1 Prüfung auf Kurzzeitplastizität

Mithilfe von sechs unterschwellig gewählten Doppelpulsen, deren Interpulsintervalle (IPI) aufsteigend zwischen 15 und 100 ms liegen, konnten die bereits im Methoden-Teil beschriebene Doppelpuls-Fazilitierungsmessungen (Paired-Pulse Facilitation, PPF) an den Körnerzellen durchgeführt werden. Der zweite Strompuls des Doppelpulses löste bei niedrigen Interpulsintervallen (IPI) ein größeres fEPSP als der erstere der beiden Doppelpulse aus. Dieser Effekt spiegelt die Mechanismen an der Präsynapse wieder und diente der Prüfung auf Kurzzeitplastizität an den Tractus Perforans-Körnerzell Synapsen.²⁴ Bei der Durchführung dieses PPF-Protokolles, ergab sich eine uneingeschränkte Funktion der präsynaptischen Mechanismen sowie keinerlei Beeinträchtigung der Kurzzeitplastizität der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse in konditionalen Nlgn2 Tieren der zweiten Kohorte. Die präsynaptische Funktion des homV-Genotypes lässt sich im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollgruppen (WtT und WtV) bei 60 ms (IPI) als effektiver einstufen, da die prozentuale Änderung der fEPSP Amplitude bei diesem Interpulsintervall signifikant erhöht ist (siehe Diskussion).

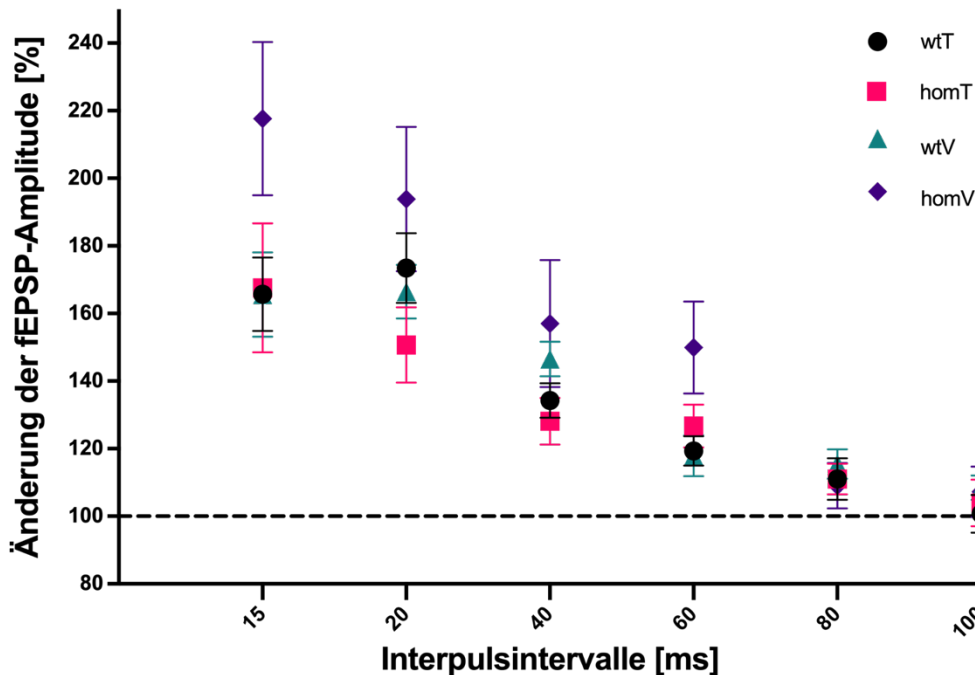


Abbildung 3.8: Doppelpuls-Fazilitierungsmessungen des Gyrus Dentatus zeigen sich unbeeinträchtigt in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen

Prozentuale Änderung der zweiten fEPSP-Amplitude im Vergleich zu der ersten fEPSP-Amplitude (y-Achse), die durch einen Doppelpuls bei verschiedenen Interpulsintervallen (x-Achse) ausgelöst werden. In der konditionalen Nlgn2 Knockout Gruppe (homT n = 7) lassen sich keine Signifikanzen gegenüber den Kontrollgruppen abgrenzen, die homV-Gruppe (n = 7) zeigt hingegen bei einem Interpulsintervall (IPI) von 60 ms eine effektivere Doppelpuls-Fazilitierung im Vergleich zu den Wt-Kontrollgruppen (wtT n = 10, wtV n = 7; bei IPI 60 ms *P = 0,0377 wtT vs. homV; *P = 0,0477 wtV vs. homV).

3.4.2 Prüfung auf Langzeitplastizität

Die persistierende Stärkung der synaptischen Transmission zeigt sich in den LTP-Messungen nach einer hochfrequenten Stimulusabfolge, der theta-burst stimulation (TBS), durch einen im Anschluss andauernden Anstieg der fEPSP Slope sowie einer persistierend vergrößerten Amplitude des Populationsspikes der Körnerzellen des Gyrus Dentatus. Der Ablauf der LTP-Messungen zur Untersuchung der synaptischen Plastizität an der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse ist der ausführlichen Beschreibung des Methoden-Teils zu entnehmen (siehe Kapitel 2.2.6). Die LTP-Induktion der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen bleibt durch diese genetische Modifikation unbeeinträchtigt, sodass sich die Input/Output-Funktion

entsprechend der Langzeitpotenzierung verändert darstellt.⁶⁹ Abbildung 3.12 zeigt ebenso vier verschiedene Säulendiagramme, welche die Mittelwerte der vier Gruppen in den ersten sowie letzten zehn Minuten nach TBS-Induktion gegenüberstellen. Die Werte der y-Achse entsprechen der prozentualen Änderung des Populationsspikes oder der fEPSP slope im Vergleich zu dem Mittelwert der ersten zehn Minuten vor TBS-Induktion.

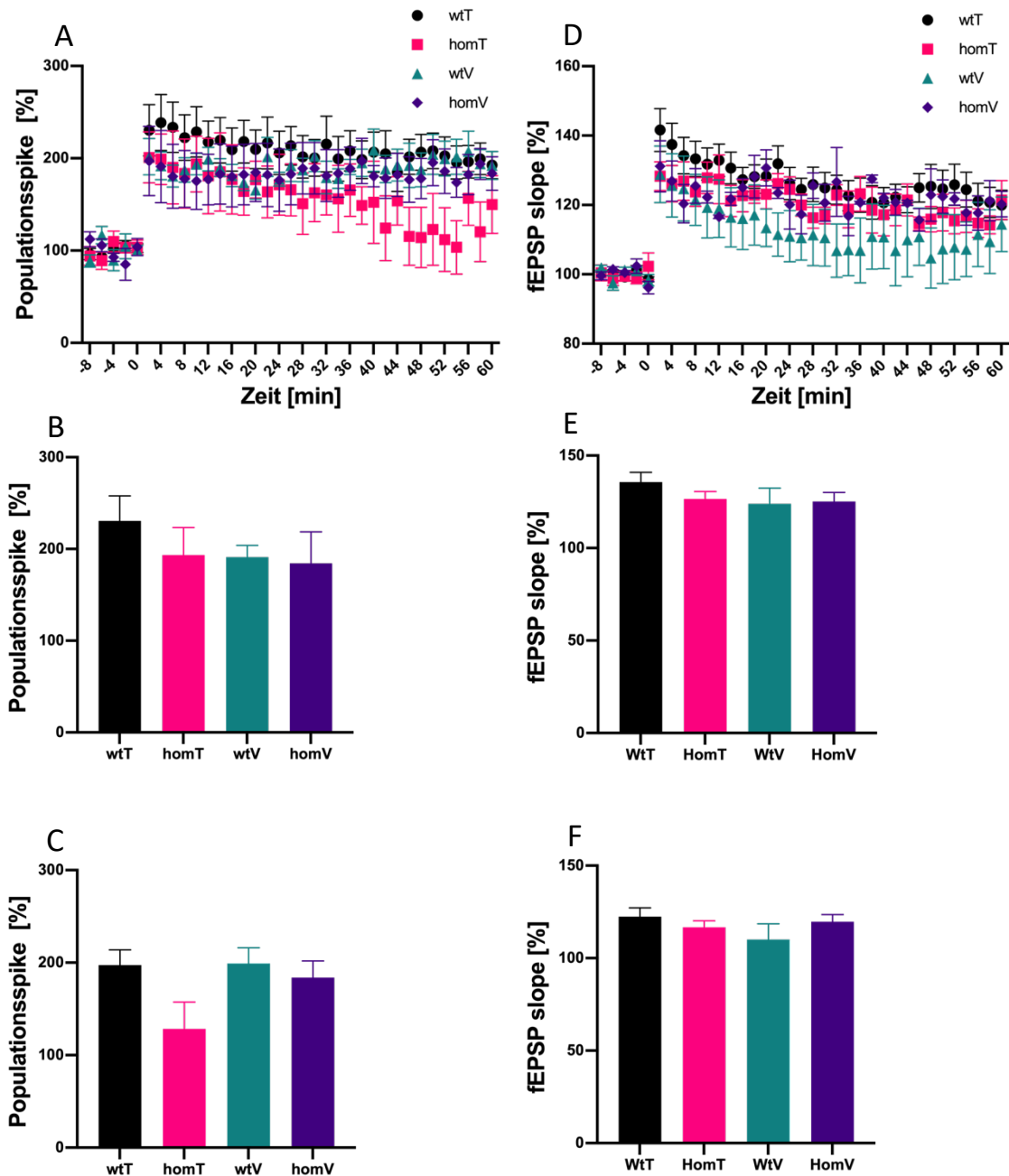


Abbildung 3.9: Die synaptische Langzeitplastizität der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse zeigt sich unbeeinträchtigt in konditionalen Ngn2 Knockout Mäusen

Die Übersichtsgraphiken (A, D) zeigen die LTP-Induzierung im Gyrus Dentatus von konditionalen Nlgn2 KO Mäusen (homT Abb. A: n = 5; Abb. B: n = 6) und den entsprechenden Kontrollgruppen (Abb. A: homV n = 6, wtT n = 11, wtV n = 7; Abb. D: homV n = 3, wtT n = 11, wtV n = 4). Auf der y-Achse ist jeweils die prozentuale Änderung des Populationsspikes (Abb. A, B, C) bzw. der fEPSP slope (Abb. D, E, F) im Vergleich zu den vor TBS-Stimulation gemittelten Vorwerten aufgetragen. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Langzeitpotenzierung der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse zwischen den einzelnen Gruppen, was anhand der Säulendiagramme mit den Mittelwerten der ersten, sowie letzten 10 Minuten nach LTP-Induktion (post TBS, theta-burst stimulation), jeweils für die fEPSP slope und den Populationsspike, ersichtlich wird. Abbildung B und E repräsentieren jeweils die Mittelwerte der 2.-10. Minute post TBS, Abbildung C und F hingegen die Mittelwerte der 52.-60. Minute post TBS.

3.5 Netzwerkinhibition im Gyrus Dentatus adulter Nlgn2 cKO

Mäusen

Um die durch inhibitorische Interneurone vermittelte GABAerge Netzwerkfunktion zu überprüfen, wurde eine weitere Doppelpulsstimulierung des Tractus Perforans durchgeführt. Bei immer größer werdenden Interpulsintervallen wurde hier zunächst mit maximaler Stimulationsstärke und in einem davon abweichenden Protokoll ebenso mit minimaler Stimulationsstärke (1 mV Populationsspike) stimuliert. Mithilfe dieses PPI-Protokolls (PPI = Paired-Pulse Inhibition) wird vor allem die perisomatische Inhibition gemessen, welche im Detail auf der Abbildung 3.8 durch Feed-Back und Feed-Forward Mechanismen beschrieben wird.^{46,71} Bei kurzen Interpulsintervallen überwiegt die Inhibition durch inhibitorische Interneurone, sodass die zweite Stimulation des Doppelpulses ein geringeres Signal auslöst. Bei größeren Interpulsintervallen kommt es zur Disinhibition (PPDI = Paired-Pulse Disinhibition), welche möglicherweise durch eine langsamer ablaufende Selbst-Inhibierung der inhibierenden Interneurone durch GABA_B-Autorezeptoren vermittelt wird.⁷² Diese Verschiebung von PPI zu PPDI zeigt sich in dem konditionalen Nlgn2 KO Modell unverändert im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen. Des Weiteren sind innerhalb des PPI-Protokolls zwischen Experimental- und den drei Kontrollgruppen keine Abweichungen der prozentualen Änderung der Amplituden der Populationsspikes feststellbar, sodass wir in Zusammenschau

der Ergebnisse von einer unbeeinträchtigten GABAergen Netzwerkinhibition ausgehen. Gegenüber einer der Kontrollgruppen (homV) zeigt sich bei einzelnen Interpulsintervallen eine Beeinträchtigung der inhibitorischen Netzwerkfunktion der Experimentalgruppe in Form einer Verminderung der prozentualen Änderung der Amplitude des Populationsspike während des PPI/PPDI-Protokolls, was in Nlgn2 KO Mäusen bereits beschrieben wurde (siehe Kapitel 4.2.3).⁴⁹

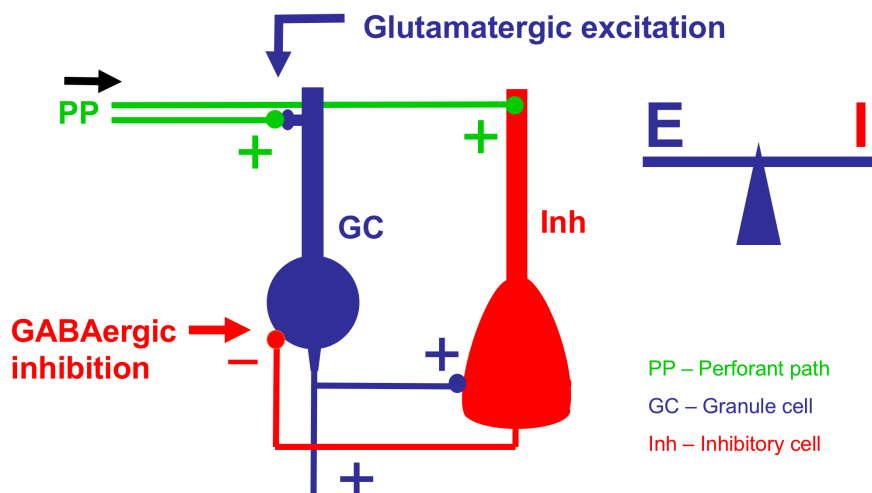


Abbildung 3.10 modifiziert nach⁴⁹: Mechanismen der Exzitation und Inhibition im Netzwerk des Gyrus Dentatus

Über den Tractus Perforans (PP) werden sowohl die Körnerzellen (GC), als auch GABAergen Interneurone (Inh) z.B. Korbzellen exzitatorisch innerviert. Die aktivierten Interneurone formen inhibierende Synapsen mit dem Soma der Körnerzellen und dienen somit der direkten Feed-Forward-Inhibition. Langsamer als die Feed-Forward-Inhibition läuft die Feed-Back-Inhibition ab: Durch die Innervation der Körnerzellen werden die inhibitorischen Interneurone ebenso aktiviert, welche wiederum die Körnerzellen inhibieren. Mithilfe dieses Netzwerkes lässt sich die Ausbalancierung von Exzitation und Inhibition im Gyrus Dentatus erklären.

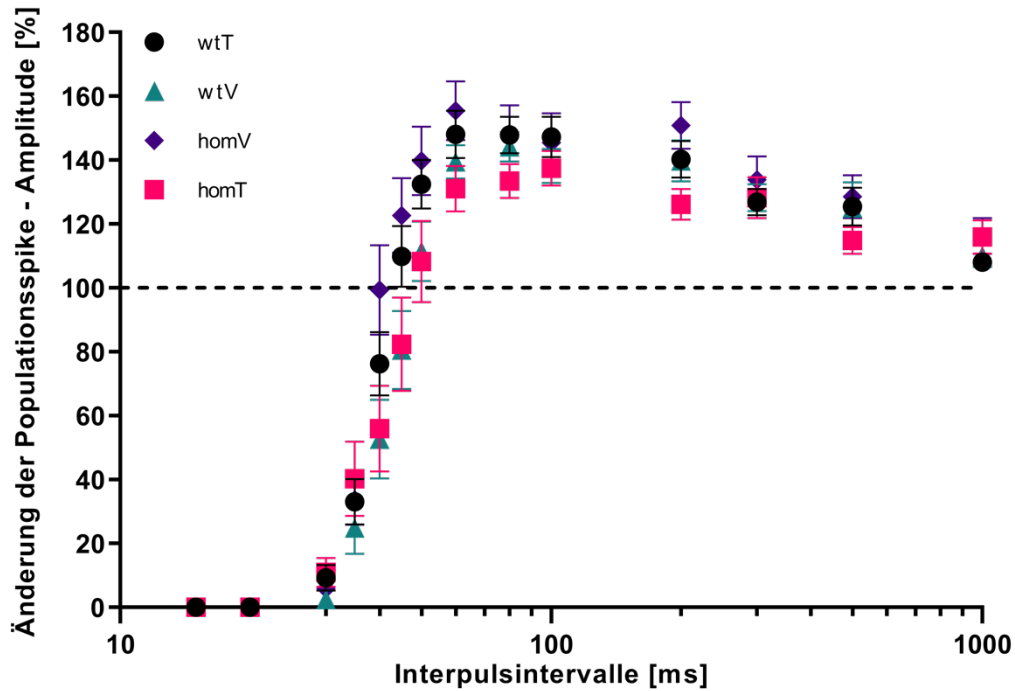


Abbildung 3.11: GABAerge Netzwerkinhibition zeigt sich unbeeinträchtigt durch den konditionalen Knockout von Nlgn2 bei maximaler Stimulation

Bei maximaler Stimulationsstärke ($800 \mu\text{A}$) wurde das Interpulsintervall (IPI, x-Achse) stetig vergrößert und die prozentuale Änderung der ersten im Vergleich zur zweiten Amplitude des Populationsspike bei Durchführung eines Doppelpuls-Protokolls gemessen. Das PPI-Protokoll repräsentiert die GABAerge Netzwerkinhibition. In konditionalen Nlgn2 KO Tieren (homT $n = 17$) zeigt sich lediglich bei einem IPI von 200 ms im Vergleich zur homV-Gruppe ($n = 14$) eine signifikante Verringerung der prozentualen Änderung der Populationsspike-Amplitude (* $P = 0,0372$ bei 200 ms). Im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen (wtT $n = 16$, wtV $n = 14$) bleibt die Netzwerkinhibition unbeeinträchtigt.

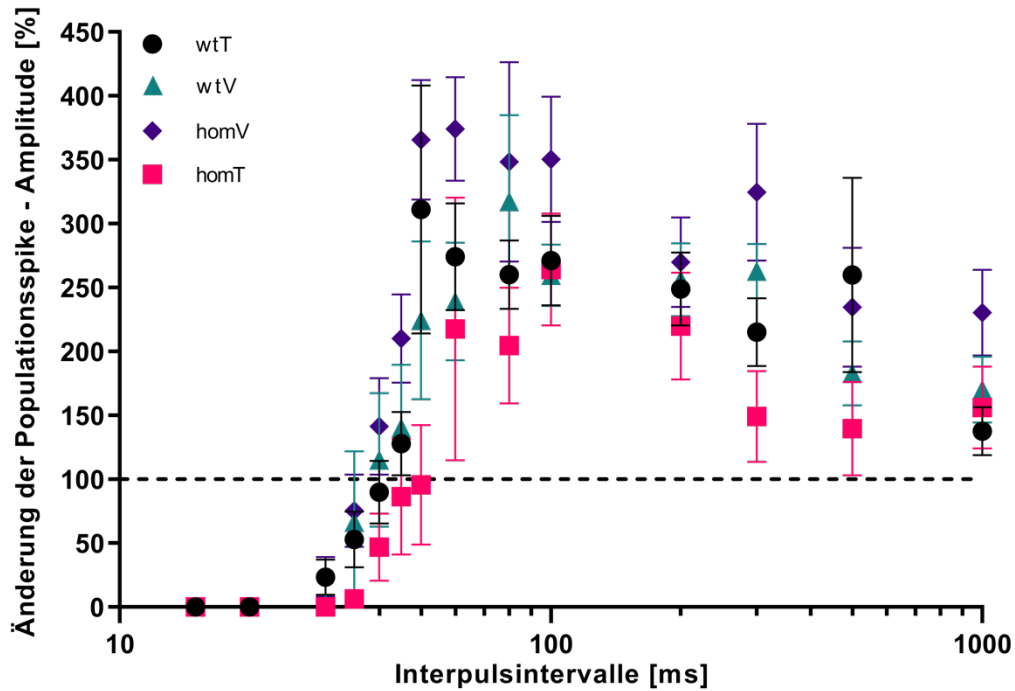


Abbildung 3.12: GABAerge Netzwerkinhibition zeigt sich unbeeinträchtigt durch den konditionalen Knockout von Nlgn2 bei minimaler Stimulation

*In der zweiten Kohorte wurde ein zweites PPI-Protokoll verwendet, bei der die Stimulationsstärke minimal gewählt wurde, sodass ein ca. 1mv großer Populationsspike abgeleitet wurde. Auch hier zeigt sich im Vergleich zu allen drei Kontrollgruppen (wtT n = 8, wtV n = 7, homV n = 7) keine Beeinträchtigung der Netzwerkinhibition in konditionalen Nlgn2 KO Tieren (n = 8). Jedoch lässt sich bei einem IPI von 50 sowie 300 ms eine signifikante Verringerung der Änderung der Populationsspike-Amplitude im Vergleich zur homV-Gruppe abgrenzen (*P = 0,0139 bei 50 ms, **P = 0,0097 bei 300 ms)*

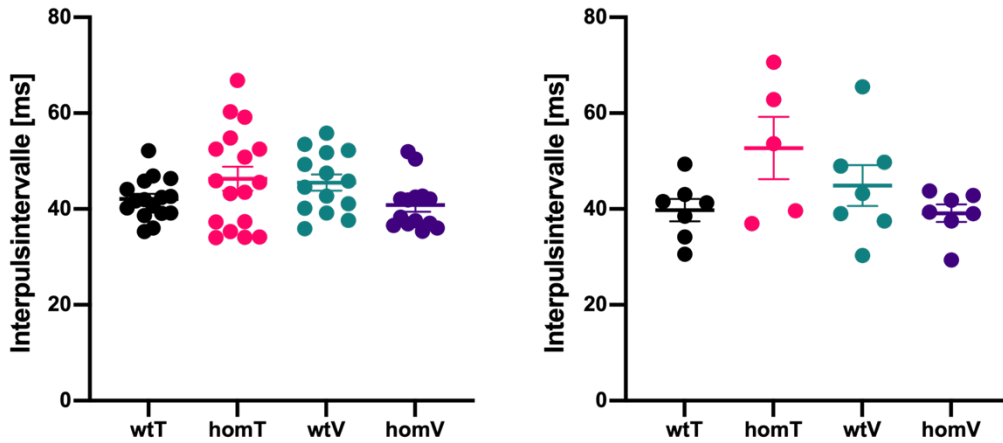


Abbildung 3.13: Keine signifikante Änderung der PPI-Dauer in konditionalen Nlgn2 KO Tieren
 Links sieht man die Angleichung der PPI/PPDI Kurven mithilfe der Boltzmann Funktion bei maximaler (homT $n = 17$, homV $n = 14$, wtT $n = 16$, wtV $n = 14$), rechts bei minimaler Stimulation (homT $n = 5$, homV $n = 7$, wtT $n = 7$, wtV $n = 7$). Auf der y-Achse ist das mittlere Interpulsintervall des PPI-Protokolls abgebildet, bei dem der erste und zweite die gleiche Amplitudengröße aufweisen. Dies repräsentiert die Dauer des PPI, welche sich zwischen den vier Gruppen nicht signifikant unterscheidet.

4 Diskussion

Neuroigin 2 ist ein Zelladhäsionsprotein der postsynaptischen Membran inhibitorischer Synapsen und für die Funktion dieser von weitreichender Bedeutung.⁴⁵ *In vivo* Daten in konventionellen Nlgn2 KO Mäusen zeigen eine erhöhte Erregbarkeit des Gyrus Dentatus sowie eine Beeinträchtigung der GABAergen Netzwerkinhibition.⁴⁹ Bisher blieb unklar, ob es sich bei den *in vivo* Ergebnissen um einen Entwicklungseffekt handelt oder ob eine Nlgn2 Deletion in adulten Tieren eine ähnlich tragende Rolle spielt. Um diese Fragestellung zu adressieren, verwendet diese Dissertation ein konditionales Nlgn2 Knockout Modell, welches es möglich macht, Nlgn2 nach abgeschlossener Hirnentwicklung zu deletieren und *in vivo* zu untersuchen. Der konditionale Knockout von Nlgn2 führt zu einer hippocampalen Proteinreduktion auf 41,07% sowie signifikanter Nlgn2 Reduktion auf Genom-Ebene. In diesem konditionalen Knockout Modell von Nlgn2 in adulten Mäusen bleibt die Exzitabilität von Körnerzellen sowie synaptische Übertragung und Plastizität der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse im Gyrus Dentatus weitgehend unbeeinflusst. Folgende Kapitel stellen den Vergleich zum konventionellen Nlgn2 Knockout Modell dar und setzen die Ergebnisse in Zusammenhang mit aktuellen Forschungsfragen.

4.1 Reduktion von Nlgn2 auf Genom- und Proteinebene

Im Vergleich zu dem konventionellen Nlgn2 Knockout⁴⁹, wird Nlgn2 in den verwendeten konditionalen Knockout Mäusen erst postnatal nach vollständiger Hirnentwicklung reduziert. Um die effektive Herstellung der konditionalen Nlgn2-Knockout Tiere zu beweisen sowie Fehler bei der Tamoxifen Applikation auszuschließen, wurde *post mortem* die Effizienz des Nlgn2 Knockouts belegt. Fehlerquellen wären beispielsweise eine zu niedrig gewählte Tamoxifen Konzentration, eine Verwechslung mit dem entsprechenden Vehikel oder eine inadäquate Lagerung des lichtempfindlichen Tamoxifens. In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich die signifikante Reduktion von Nlgn2 auf Genom- und Proteinebene nachweisen. Die Ergebnisse der Genotypisierung der Schwanzspitzen (siehe Abbildung 3.1) beweisen die Effizienz dieses globalen Knockouts in dem hier verwendeten konditionalen Nlgn2 KO Modell. Der

konditionale Knockout ist nicht vergleichbar mit heterozygoten Nlgn2 Knockout Tieren, bei denen jede Zelle ein intaktes Allel besitzt, welches kompensatorisch wirken kann. In unserem Modell lassen die binären Eigenschaften der Cre-Rekombinase insbesondere zwei Optionen offen: Die Rekombinase exzidiert Nlgn2 mittels Rekombination der loxP-Stellen oder es kommt nicht zu dieser Rekombination und Exzision. Es lässt sich jedoch anhand der von Cruces-Solis und Babaev et al. gezeigten Protein-Reduktion in der Amygdala und unseren Westernblotting Ergebnissen des Hippocampus zeigen, wie unterschiedlich die Reduktion von Nlgn2 auf Proteinebene in Abhängigkeit von der Hirnregion sein kann.⁵⁷ Bei Gegenüberstellung der Western-Blotting Ergebnisse unserer und Dilja Krueger-Burgs Gruppe könnte man diese gewebespezifische Reduktion (siehe Abbildung 4.1) auch auf den unterschiedlichen experimentellen Rahmen zurückführen, in dem die Daten erhoben wurden. Aus der persönlichen Kommunikation mit Dilja Krueger-Burg und Ihrer Gruppe geht jedoch hervor, dass ihre Western-Blotting Ergebnisse ebenso nur eine limitierte Reduktion des Proteinlevels von Nlgn2 im Hippocampus trotz konditionaler Eliminierung im Vergleich zu anderen Hirnregionen aufweisen. Eine verminderte Rekombination durch die Cre-Rekombinase und somit auch Exzision von Nlgn2 könnten für diese verminderte Proteinreduktion im Hippocampus verantwortlich sein.⁷³ Ursächlich hierfür wäre beispielsweise eine zu gering gewählte Dosierung oder Applikationsdauer von Tamoxifen, da die Anzahl der rekombinierten Zellen dosisabhängig ist.^{73,74} Ein Vergleich dieser Rekombinationseffizienz ist sehr komplex, da eine Vielzahl von Protokollen mit unterschiedlichen Dosierungen sowie Applikationsmethoden unterschiedlicher Applikationsdauer existieren.⁷³ Zudem könnte man von einer insgesamt geringeren Gewebepenetration von Tamoxifen im Hippocampus ausgehen, sodass es sinnvoll wäre, eine höhere Tamoxifen-Konzentration zu wählen. Beim Vergleich mit anderen Applikationsprotokollen fällt jedoch auf, dass die von Dilja Krueger-Burg und Ihrer Gruppe übernommene Tamoxifen-Dosierung (fünf Tage täglich je 200 mg/kgKG Tamoxifen) bereits einer höheren Dosis entspricht, da viele Gruppen für ihre Experimente die Hälfte dieser Dosis verwenden.⁷⁵⁻⁷⁹ Die Dauer der Tamoxifen Applikation von fünf Tagen ist in der Literatur vielfach beschrieben, um Gene konditional zu eliminieren.⁵⁷ Zu hohe Tamoxifen-Dosen könnten die elektrophysiologischen Experimente durch die neurotoxische Wirkung hingegen

stark beeinflussen oder bereits zuvor letale Folgen für die Mäuse haben.⁶² Für eine Erhöhung der Tamoxifen-Dosierung sprechen Studien, die zeigen, dass kurzfristige Tamoxifen Applikationen, wie wir sie durchführen, eine sehr geringe toxische Wirkung nach sich ziehen.^{78,80} Der LD-50-Wert für die orale Tamoxifen-Applikation liegt zwischen 3-6 g/kg, sodass unsere gewählte Dosis von 200 mg/kgKG noch gesteigert werden könnte.⁸⁰

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Cre-Rekombinase, welche mit dem Östrogenrezeptor fusioniert ist (siehe Abbildung 2.3), im Hippocampus vermindert exprimiert wird.^{62,73} Dies würde zu einer verminderten Rekombination und somit auch Exzision von Nlgn2 führen. Abgesehen von einem verminderten Level an Expression, wäre diese Effizienz auch bei einer verminderten Translokation der Cre-Rekombinase in den Nucleus beeinträchtigt, welche möglicherweise nicht in allen Zelltypen gleich abläuft. Die Effizienz solcher fusionierten Proteine (Cre-ER) kann gewebeabhängig variieren, sodass sogenannte genetische Mosaizismen entstehen.^{62,81} Zudem spielt der Ort des Zielgens (hier: Nlgn2) für die effiziente Rekombination eine große Rolle und kann gewebespezifische Variationen aufweisen. Der Chromatin-Aufbau sowie epigenetische Modifikationen beispielsweise Methylierungen des geflochten Gens können die Zugänglichkeit zu dem Gen und damit die Effizienz der Cre-Rekombinase beeinflussen.⁷³

Bei der Interpretation der elektrophysiologischen Ergebnisse ist deshalb zu beachten, dass das Protein Level im Hippocampus lediglich auf 41,07% im Vergleich zur Kontrollgruppe 3 (wtV) reduziert wurde ($P < 0,05$). Cruces-Solis und Babaev et al. zeigten, dass bei einer suffizienten konditionalen Nlgn2 Elimination, wie sie in der Amygdala vorzufinden ist (siehe Abbildung 4.1), ein verstärktes Angstverhalten festgestellt werden kann. Weitaus eindeutiger zeigt sich dieser Effekt in Nlgn2 KO Mäusen.⁴³ Bei einer solch insuffizienten Nlgn2 Proteinreduktion hingegen, wie sie im Hippocampus konditionaler Nlgn2 Knockout Tiere vorzufinden ist, könnten die elektrophysiologischen Effekte im adulten Tier trotz weiterhin tragender Rolle von Nlgn2 abgeschwächt bis gar nicht sichtbar sein.

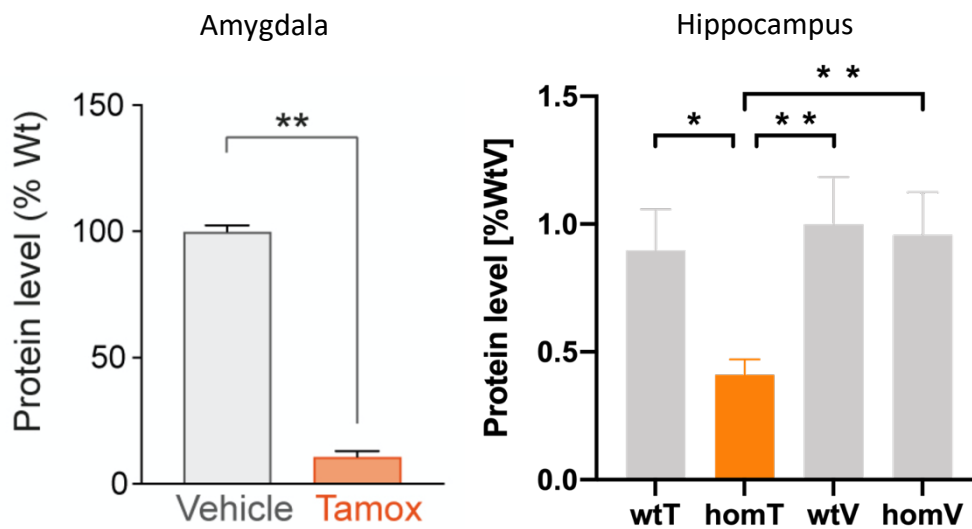


Abbildung 4.1 modifiziert nach⁵⁷: Proteinreduktion von Nlgn2 in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen in Amygdala und Hippocampus

Die Abbildung zeigt eine stärkere prozentuale Reduktion des Proteinlevels von Nlgn2 in der Amygdala (links)⁵⁷ im Vergleich zum Gewebe des Hippocampus (rechts, siehe Kapitel 3.1) in mit Tamoxifen behandelten Cre-homozygote konditionalen Nlgn2 KO Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes. Die Experimente zur Datenerhebung für diese zwei Graphen wurden in zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen durchgeführt.

4.2 Elektrophysiologische Experimente im Gyrus Dentatus von Nlgn2 cKO Mäusen

4.2.1 Exzitabilität der Körnerzellen

Die Input/Output-Funktion des Populationsspikes, als Maß für die Erregbarkeit der Körnerzellen, sowie der Vergleich der Frequenzschwelle für epilepsieähnliche Aktivität bleiben weitgehend unbeeinflusst durch den konditionalen Knockout von Nlgn2.²⁶ In konventionellen Nlgn2 Knockout Mäusen konnten Jedlicka et al. eine Verminderung der Reizschwelle für Populationsspikes und eine Vergrößerung der Amplitude des Populationsspikes im Vergleich zum Wildtyp nachweisen (siehe Abbildung 1.6).⁴⁹ Diese signifikanten Ergebnisse zeichnen sich in dem konditionalen Nlgn2 Knockout Modell jedoch nicht ab. Die Experimentalgruppe zeigt sich graphisch in den Abbildungen 3.3.-3.5. den anderen Gruppen hinsichtlich der Amplitude des Populationsspikes zwar überlegen, jedoch ohne Signifikanzen gegenüber den drei Kontrollgruppen vorzuweisen. Aus diesem Grund sind die Signifikanzen, die

sich in der zweiten Kohorte lediglich zwischen der 3. Kontrollgruppe (wtV) und Experimentalgruppe bei einer Stimulationsstärke von 150 μ A sowie 175 μ A abzeichnen, allenfalls als Trend oder Zufallsbefund zu werten. Bei einer erhöhten Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus würden wir gegenüber jeder der Kontrollgruppen signifikante Erhöhungen der Amplitude des Populationsspikes bei mehreren Stimulationsstärken erwarten. Für einen Trend spricht die insuffiziente Proteinreduktion im Hippocampus auf lediglich 41,07%, bei der nicht die gleichen, eindeutigen elektrophysiologischen Effekte wie bei dem konventionellen Knockout Modell zu erwarten sind. Jedoch lässt sich hierdurch nicht ausschließen, dass das Fehlen von Nlgn2 für die Netzwerkaktivität im Gyrus Dentatus vor allem während der Entwicklungsphase eine Rolle spielt und der Knockout in adulten Tieren deshalb möglicherweise keine erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen erzielt. Eine ausführliche Diskussion dieser zwei Optionen folgt in Kapitel 4.3. Ein weiterer Beleg für die unveränderte Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen ist der Abbildung 3.13 zu entnehmen. Es zeigt sich eine unveränderte Frequenzschwelle, um epilepsieähnliche Aktivität (Multiple Spike Discharges) auszulösen. In konventionellen Nlgn2 Mäusen hingegen zeigt sich diese Frequenzschwelle aufgrund der erhöhten Erregbarkeit der Körnerzellen signifikant erniedrigt.⁴⁹

4.2.2 Synaptische Transmission

Beim Betrachten der Input/Output-Funktion der fEPSP slope als Maß für die Effizienz der synaptischen Übertragung an der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse zeigen sich diese Messungen in konditionalen Nlgn2 Knockout Mäusen unbeeinträchtigt. Auch im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell zeichnen sich keine Veränderungen der synaptischen Transmission im Gyrus Dentatus ab, weshalb dieses Ergebnis den Beobachtungen in Nlgn2 KO Mäusen entspricht.⁴⁹ Zwischen den zwei Wildtyp-Gruppen für die Cre-Rekombinase (Wt Vehikel, Wt Tamoxifen) lässt sich bei einer Stimulationsstärke von 650 und 600 μ A eine signifikante Erniedrigung der fEPSP slope der Wt-Tamoxifen Gruppe beobachten. Die Werte der Wt-Tamoxifen Kohorten fielen bei den Input/Output-Messungen der fEPSP slope insgesamt geringer aus (siehe Abbildung 3.6 und

3.7) und auch bei hoher Stimulationsstärke zeigt sich in der zweiten Kohorte der Input/Output-Funktion des Populationsspikes bereits ein ähnlicher Trend (siehe Abbildung 3.4). Es lässt sich folglich mutmaßen, dass Tamoxifen die synaptische Transmission an der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse verringert und vielleicht sogar die Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus beeinflusst.

Es sind Hinweise dafür zu finden, dass die Applikation von Tamoxifen die Zellen des zentralen Nervensystems stresst und somit in ihrer Funktion beeinträchtigt.⁸² Tamoxifen wirkt modulatorisch am Östrogenrezeptor (siehe Abbildung 2.3), sodass hierdurch bereits eine ungewollte Beeinflussung der Experimente entstehen könnte.⁶² Nach Applikation von Tamoxifen verändert sich das Verhalten der Tiere im Sinne einer objektivierbaren Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktion.⁸³ Des Weiteren werden auch elektrophysiologisch messbare Veränderungen, beispielsweise in pyramidalen Neuronen, zugunsten einer verminderten Erregbarkeit beobachtet.⁸⁴ Zudem führt eine Einflussnahme auf den Östrogenspiegel zu messbaren elektrophysiologischen Konsequenzen, beispielsweise kommt es bei zyklusabhängigem erhöhtem Östrogenspiegel zu einer Verstärkung der Langzeitpotenzierung in weiblichen Tieren.⁸⁵ Diese Beobachtungen basieren jedoch auf akuten Effekten, bei denen die Tiere Tamoxifen oder Östrogen ausgesetzt werden. In unseren Experimenten vergehen hingegen mindestens sechs Wochen zwischen Tamoxifen-Applikation und der elektrophysiologischen Versuchsreihe. In der Literatur sind allerdings auch langfristige Effekte nach kurzfristiger Applikation von Tamoxifen auf die Expressionslevel verschiedener Gene beschrieben⁸⁶ sowie anhaltende Veränderungen des Verhaltens von Mäusen nach fünftägiger Tamoxifen-Applikation.⁸⁷ Zusammenfassend können wir eine Beeinflussung der Netzwerkaktivität des Gyrus Dentatus durch die Tamoxifen-Applikation nicht ausschließen. Unsere elektrophysiologischen Beobachtungen bestätigen die Auswahl der drei Kontrollgruppen (siehe Kapitel 2.2.3), da eine Beeinflussung der elektrophysiologischen Experimente durch die Anwesenheit von Tamoxifen und ebenso durch die Cre-Rekombinase nicht auszuschließen ist. In unpublizierten Experimenten von Dilja Krueger-Burg und Ihrer Gruppe zeigte sich ein Effekt der Cre-Rekombinase und Tamoxifen auf das Verhalten männlicher Tiere, weshalb initial bereits vier Gruppen verwendet wurden. Für die Auswahl

dieser vier Gruppen sprechen zahlreiche Daten, bei denen eine geringfügige eigenständige Aktivität der Cre-Rekombinase ohne Tamoxifen-Applikation, eine sogenannte Leakiness des Cre-LoxP Systems, aufgefallen ist.^{62,88,89}

Da sich zwischen den homozygoten Gruppen (homozygot für Cre/Vehikel, homozygot für Cre/Tamoxifen) keine Unterschiede zeigen, könnte man vermuten, die elektrophysiologischen Effekte der Nlgn2 Deletion seien in der Experimentalgruppe (homozygot, Tamoxifen) durch langfristige Tamoxifen-Effekte abgeschwächt worden. Dies würde wiederum für eine erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus auch im konditionalen Knockout Modell sprechen, wie sie im konventionellen Knockout beobachtet wird und somit die Relevanz von Nlgn2 nach abgeschlossener Hirnentwicklung bestätigen.

4.2.3 Netzwerkinhibition

Die durch inhibitorische Interneurone vermittelte GABAerge Netzwerkinhibition an Tractus Perforans-Körnerzell Synapsen bleibt in konditionalen Nlgn2 Mäusen intakt. Im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell zeigt sich die Funktion der hemmenden Interneuronen hingegen signifikant beeinträchtigt (siehe Abbildung 4.2).⁴⁹ Dies lässt sich in Nlgn2 KO Mäusen anhand der insgesamt verminderten Populationsspike Amplitude sowie einer Linksverschiebung der PPI/PPDI (Paired-Pulse Inhibition/Disinhibition) Kurve zugunsten einer verfrühten PPDI zeigen. Auch das mittlere Interpulsintervall, bei dem der erste und zweite Populationsspike nach Doppelpulsstimulation die gleiche Amplitudengröße annehmen, bleibt in Nlgn2 KO Mäusen signifikant vermindert. Dies spricht für eine insgesamt kürzere PPI-Dauer, folglich einer verminderten Hemmung durch inhibitorische Interneurone. Diese Parameter wurden auch in dem konditionalen Nlgn2 Knockout Modell verglichen ohne jedoch signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen aufzuweisen. Das verbliebene Nlgn2 im Hippocampus könnte beispielsweise ausreichend sein, die Funktion der inhibitorischen Interneurone in konditionalen Knockout Mäusen aufrecht zu erhalten. Wenn man die Experimentalgruppe lediglich mit der homV-Kontrollgruppe vergleicht, zeigt sich bei einzelnen Interpulsintervallen eine

Abschwächung der prozentualen Änderung der Amplitude des Populationsspikes, wie sie auch im konventionellen Knockout Modell zu finden ist. Dieser Effekt der beeinträchtigten inhibitorischen Netzwerkfunktion zeigt sich jedoch nicht gegenüber allen drei ausgewählten Kontrollgruppen.

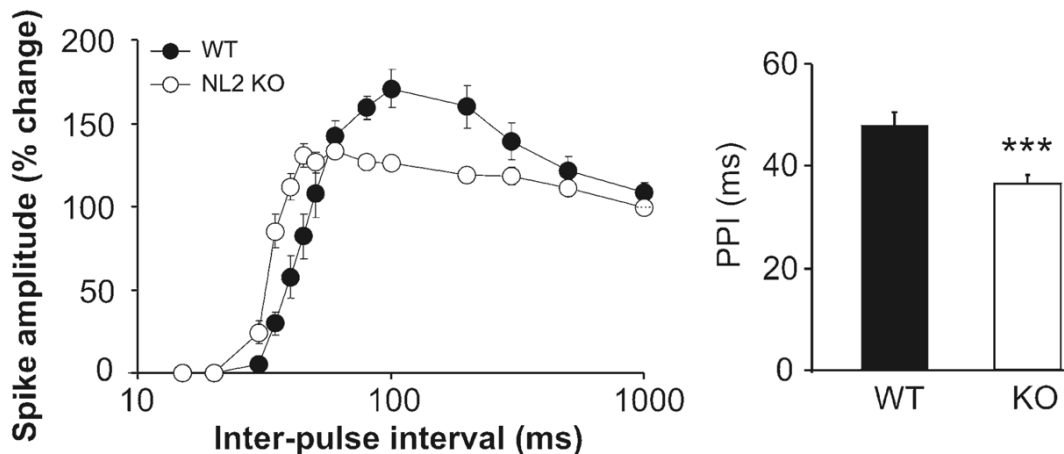


Abbildung 4.2 nach⁴⁹: Beeinträchtigung der GABAergen Netzwerkinhibition des Gyrus Dentatus in Nlgn2 KO Mäusen

Mithilfe einer Doppelpulsstimulierung der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse zeigt sich bei geringen Interpulsintervallen zunächst eine PPI (Paired-Pulse Inhibition), gefolgt von einer PPDIs (Paired-Pulse Disinhibition) bei größeren Intervallen. Im konventionellen Nlgn2 KO Modell zeigt sich die PPI/PPDI Kurve als Maß für die GABAerge Netzwerkinhibition beeinträchtigt in Form einer Linksverschiebung sowie amplitudengeminderter Kurve (Abb. links). Die PPI-Dauer (Abb. rechts) ist in Nlgn2 KO Mäusen signifikant vermindert, sodass es zur verfrühten PPDIs kommt.

4.2.4 Kurz- und Langzeitplastizität

Bei konventioneller und konditionaler Eliminierung von Nlgn2 bleibt die präsynaptische Funktion der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse, die der Prüfung auf erhaltene Kurzzeitplastizität dient, in vollem Umfang bestehen.⁴⁹ Dies lässt sich aufgrund der streng postsynaptischen Lokalisation und Netzwerkfunktion von Nlgn2 bereits mutmaßen.^{46,49} Mithilfe der Doppelpuls Fazilitierungsmessungen (Paired-Pulse Facilitation, PPF) kann insbesondere die präsynaptische Funktion geprüft werden, die sich beim Vergleich der Experimental- mit den drei Kontrollgruppen in konditionalen Nlgn2 KO Mäusen unbeeinträchtigt zeigt. Die homV-Gruppe (homozygot für die Cre-Rekombinase, Behandlung mit Vehikel statt Tamoxifen) zeigt bei einem Interpulsintervall von 60

ms jedoch gegenüber den Wildtyp-Kontrollgruppen (WtT und WtV) eine effektivere Funktion der Präsynapse in Form einer erhöhten prozentualen Änderung der fEPSP Amplitude. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wären eine Begünstigung der präsynaptischen Funktion durch die Cre-Rekombinase, wobei dieser Effekt durch eine Behandlung mit Tamoxifen oder eine konditionale Eliminierung von Nlgn2 vermindert werden müsste, da die homT-Gruppe keine verbesserte präsynaptische Funktion aufweist. Die Beeinflussung der präsynaptischen Funktion durch das Fehlen von Nlgn2 ist jedoch aufgrund vorheriger elektrophysiologischer Experimente⁴⁹ sowie dem bisherigen Verständnis von Funktion und Lokalisation⁹⁰ als unwahrscheinlich anzusehen. Deshalb wäre am ehesten eine Verminderung der Kurzzeitplastizität durch die Tamoxifen-Behandlung anzunehmen. Hierfür wiederum ergibt sich beim Vergleich der Wildtyp-Kontrollgruppen (WtV und WtT) kein Anhalt (siehe Abbildung 3.8). Das PPF Protokoll bietet allerdings intrinsische Fehlerquellen, weshalb eine biologische Bedeutung dieser einzelnen Signifikanz bei einem einzelnen Interpulsintervall in Zusammenhang der vorangegangenen Argumentation anzuzweifeln ist. Die Ungenauigkeit des PPF-Protokolls besteht darin, dass zur Doppelpulsstimulation eine Stärke verwendet werden muss, bei der einerseits keine Populationsspiques erreicht werden, andererseits deutlich sichtbare fEPSPs abgegrenzt werden können (siehe Methoden-Teil). Hierzu muss die Stimulationsstärke pro Tier individuell angepasst werden, um diese unterschwellige Stimulation zu erreichen. Aufgrund dieser individuellen Anpassung der Stimulationsstärke sowie oben ausgeführter Argumentation lässt sich am ehesten mutmaßen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein zufälliges Ergebnis handelt. Hierfür spricht ebenso, dass das festgelegte Signifikanzniveau von $P < 0,05$ lediglich geringfügig unterschritten wird ($P = 0,0377$ wtT vs. homV; $P = 0,0477$ wtV vs. homV).

Während der LTP-Messungen lässt sich die Langzeitplastizität an der Tractus Perforans-Körnerzell Synapse des Gyrus Dentatus überprüfen, indem die Körnerzellen nach Ableitung einer Baseline hochfrequent stimuliert werden (Theta Burst Stimulation). Beim statistischen Vergleich wurden jeweils die ersten zehn Minuten vor TBS-Induktion (Populationsspike und fEPSP slope) gemittelt und mit den ersten und letzten zehn Minuten nach der TBS-Stimulation

verglichen. Die Langzeitplastizität bleibt bei der konditionalen Elimination von Nlgn2 unbeeinträchtigt, was auch im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell bereits gezeigt werden konnte.⁴⁹ Durch die Länge der Messung nach TBS-Induktion von insgesamt 60 Minuten konnte die Beständigkeit der Langzeitpotenzierung überprüft werden.²⁸ Beim statistischen Vergleich der Baseline-Mittelwerte des Populationsspikes (vor TBS-Stimulation) und dem Mittelwert des Populationsspikes der letzten zehn Minuten (nach TBS-Stimulation) zeigt sich in der Experimentalgruppe ein Trend zur abgeschwächten LTP-Beständigkeit (siehe Abbildung 3.9: 52-60 min post TBS). Das Signifikanzniveau gegenüber den drei Kontrollgruppen ist hierbei verringert, weist jedoch kein suffizientes Signifikanzniveau, definiert als $P < 0,05$, auf. Im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell wurde lediglich das Slope-LTP und kein Spike-LTP untersucht, sodass unklar bleibt, ob sich der beobachtete Trend im Nlgn2 Knockout Modell bestätigen würde.⁴⁹ Hierbei ist hervorzuheben, dass sich in Nlgn1 Knockout Mäusen die LTP Elektrophysiologie im Hinblick auf Spikemessungen in der Amygdala beeinträchtigt zeigt.⁹¹ Es wären weitere Untersuchungen von Nöten, um herauszufinden, inwiefern der Mangel an Nlgn2 die Langzeitplastizität im Gyrus Dentatus beeinflusst. Es ist bekannt, dass postsynaptische Vorgänge sowie GABAerge Inhibition synaptische Plastizität im Hippocampus beeinflussen.^{29,92} Deshalb erscheint es durchaus möglich, dass der Knockout von Nlgn2, einem an der postsynaptischen Membran der inhibitorischen Synapse lokalisierten Zelladhäsionsprotein, zur Modulierung von Langzeitplastizität führen könnte. Wigström und Gustafsson konnten bereits 1983 zeigen, dass die LTP-Induktion im Hippocampus bei reduzierter Inhibition begünstigt wird.⁹²

4.2.5 Limitationen der elektrophysiologischen

Untersuchungsmethode

Um die experimentellen Daten dieser Dissertation adäquat einordnen zu können, sollte der methodische Ansatz kritisch hinterfragt werden. Eine Untersuchung der molekularen Mechanismen der synaptischen Plastizität und Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus kann nur erfolgen, wenn die Nervenzellen und synaptischen Verbindungen in einem weitgehend intakten Zustand sind. Somit

ist zur elektrophysiologischen Untersuchung physiologischer Prozesse, wie beispielsweise Lernen und Gedächtnisbildung, ein *in vivo* Tiermodell besonders aussagekräftig. Die *in vivo* Elektrophysiologie ist eine besonders realitätsnahe Methode, da das Netzwerk der Neuronen des Hippocampus bei den Messungen im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten intakt belassen wird. Änderungen des Verhältnisses von Exzitation zu Inhibition, welche im konventionellen Nlgn2 Knockoutmodell beobachtet werden⁴⁹, können mithilfe dieses methodischen Vorgehens untersucht werden.⁵¹ Aus kritischer Perspektive ist hingegen anzumerken, dass subtile Veränderungen mit dieser Methodik möglicherweise übersehen werden, da sie durch Kompensationsmechanismen des Netzwerks relativiert oder maskiert werden. Des Weiteren sind Experimente in narkotisierten Tieren nicht mit denen in wachen Tieren gleichzusetzen, sodass immer von einer gewissen Verzerrung der physiologischen Funktion ausgegangen werden sollte. Das zur Anästhesie der Tiere verwendete Urethan wird jedoch gehäuft für elektrophysiologische Experimente eingesetzt wegen der weitgehend unbeeinträchtigten Funktion des vegetativen Nervensystems bei weiterhin erhaltenen spinalen Reflexen.⁹³

Um die Fragestellung der Dissertation unter physiologischeren Bedingungen anzugehen, kämen *in vivo* Modelle in Frage, bei denen die Hirnaktivität in nicht-narkotisierten Tieren mittels chronischer Implantate abgeleitet werden kann.⁹⁴ Hierdurch würden durch die Narkosesubstanzen verfälschte elektrophysiologische Effekte vermieden werden. Von Vorteil wären hierbei auch sogenannte Tetroden oder lineare Sonden, die eine bessere räumliche Ableitung der elektrophysiologischen Messungen ermöglichen. Zudem wäre es zum besseren Verständnis der synaptischen Transmission hilfreich, in einem konditionalen Nlgn2 Knockout Modell die Aktivität einzelner Körnerzellen zu messen. Die bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen konzentrieren sich auf die Auswirkungen des Nlgn2 Knockouts auf eine gesamte Population von Körnerzellen. Zur detaillierteren Beobachtung synaptischer Mechanismen einzelner Körnerzellen ergänzten Jedlicka et al. *in vitro* whole-cell patch-clamp Aufnahmen von GABAergen miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) in hippocampalen Hirnschnitten, welche die reduzierte GABAerge Netzwerkinhibition in Nlgn2 Knockout Mäusen bestätigten.⁴⁹ In zwei

unterschiedlichen Hirnregionen konnte eine Beeinträchtigung dieser mIPSCs im konditionalen Nlgn2 Knockout Modell bereits belegt werden.^{95,96} Eine Ergänzung dieser Experimente in konditionalen Nlgn2 Knockout-Tieren ist deshalb in Zukunft anzustreben, um auch subtilere Effekte sichtbar zu machen. Neben der Möglichkeit des whole-cell patch-clamping *in vitro* gibt es auch Studien, die dies *in vivo* durchführen, und somit realitätsnahe Untersuchungsbedingungen mit der Messung einzelner Körnerzellen verbinden.^{97,98}

Dem ist kritisch hinzuzufügen, dass das Alter der Mäuse in der Literatur als relevanter Störfaktor bei Untersuchung der synaptischen Plastizität beschrieben wird. Insbesondere die Stabilität der LTP-Messung ist stark vom Alter der Tiere abhängig und zeigt sich bei zunehmendem Alter beeinträchtigt.^{31,70} Im Durchschnitt sind die konditionalen Nlgn2 Knockout Mäuse 17 Wochen alt, die in Jedlicka et al. verwendeten Tieren zum Vergleich deutlich jünger, nämlich 5-12 Wochen.⁴⁹ Dies erschwert den Vergleich der elektrophysiologischen Ergebnisse des konventionellen und konditionalen Nlgn2 Knockouts. Zum besseren Vergleich der konditionalen Nlgn2 KO Tiere mit dem konventionellen Nlgn2 KO Modell wäre es außerdem hilfreich gewesen, die gleiche Stimulationselektrode wie bei Jedlicka et al. zu verwenden, was aus Herstellungsgründen leider nicht möglich war. Die Amplituden des Populationsspikes lassen sich somit nicht adäquat mit den Experimenten von Jedlicka et al. vergleichen, da jeweils verschiedene Stimulationselektroden verwendet wurden, die sich auf die Amplitude des Populationsspikes (mV) auswirken.

4.3 Bedeutung von Nlgn2 für die Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus

Das verwendete konditionale Knockout Modell zeigte nach Tamoxifen Applikation eine signifikante Reduktion von Nlgn2 auf Protein- und Genom-Ebene. Trotzdem konnte die Dissertation mithilfe dieses Versuchsmodells nicht abschließend klären, inwieweit Nlgn2 die Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus in adulten Mäusen beeinflusst. Beim Vergleich der Ergebnisse mit denen des konventionellen Nlgn2 Knockouts ergibt sich erstens die Möglichkeit, dass Nlgn2 in adulten Tieren bei abgeschlossener Hirnentwicklung für die Netzwerkinhibition

der Körnerzellen des Gyrus Dentatus sowie die Aufrechterhaltung des Verhältnisses zwischen Exzitation/Inhibition keine tragende Rolle mehr spielt. Zweitens wäre es möglich, dass die hier erreichte hippocampale Proteinreduktion von Nlgn2 auf 41,07% nicht genügt, um elektrophysiologische Effekte wie sie im konventionellen Knockout nachweisbar sind, zu erzielen. Für diese zweite Hypothese sprechen Experimente in anderen konditionalen Nlgn2 Knockout Modellen, bei denen die Bedeutung von Nlgn2 über die entwicklungsassoziierte Synaptogenese hinaus gezeigt werden konnte. Diese Experimente in adulten Mäusen belegen, dass Nlgn2 für eine adäquate Funktion inhibitorischer Synapsen auch nach abgeschlossener Hirnentwicklung notwendig ist. Bei konditionaler Eliminierung von Nlgn2 im lateralen Septum sowie im medialen präfrontalen Cortex, zeigt sich eine reduzierte inhibitorische Transmission an der Postsynapse.^{63,96} Troyano-Rodriguez et al.⁹⁶ und Liang et al.⁹⁵ konnten somit Hinweise liefern, dass Nlgn2 auch nach abgeschlossener Hirnentwicklung für die Aufrechterhaltung des Verhältnisses von Exzitation zu Inhibition benötigt wird. Bei konditionaler Eliminierung von Nlgn2 im adulten Tier zeigt sich dieses Exzitation/Inhibition-Verhältnis zugunsten einer erhöhten Exzitation verändert. Dies konnte Jedlicka et al. auch für die Netzwerkaktivität des Gyrus Dentatus im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell zeigen.⁴⁹ Es ist folglich anzunehmen, dass die Deletion von Nlgn2 im adulten Tier ähnliche Effekte im Hippocampus aufweist, wie sie in anderen Hirnregionen bereits experimentell nachgewiesen wurden. Diese elektrophysiologische Relevanz von Nlgn2 im konditionalen Knockout Modell konnten wir bisher jedoch nicht zeigen. Hierfür sind neben Einschränkungen durch die konditionale Knockout-Methode und insuffiziente Proteinreduktion (siehe Kapitel 4.1), elektrophysiologische Limitationen (siehe Kapitel 4.2.5) sowie andere Kompensationsmechanismen an der Synapse in Betracht zu ziehen.

Im konventionellen Nlgn2 Knockout Modell zeigt sich eine Beeinträchtigung der GABAergen Netzwerkinhibition sowie eine erhöhte Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus. Diese klaren Effekte des konventionellen Nlgn2 Knockout könnten in dem verwendeten konditionalen Knockout Modell durch die Restfunktion von Nlgn2 oder andere inhibitorisch wirksame Proteine kompensiert werden. Das Protein Nlgn3 beispielsweise nimmt Einfluss auf die Funktion

inhibitorischer Synapsen,^{99,100} im Gegensatz zu Nlgn1, das vornehmlich an exzitatorischen Synapsen zu finden ist.¹⁰¹ Es ist nicht auszuschließen, dass auch Nlgn4 die Reduktion von Nlgn2 teilweise kompensieren könnte, da der singuläre Knockout von Nlgn4 zu einer Beeinträchtigung der inhibitorischen synaptischen Transmission im Hippocampus von Mäusen führt.¹⁰² Es wäre außerdem in Betracht zu ziehen, dass Nlgn2 in der vorhandenen Konzentration (Proteinmenge im Hippocampus 41,07%) ausreicht, um die Funktion der inhibitorischen Synapse zu gewährleisten und das Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition aufrecht zu erhalten. Aus evolutionärer Perspektive könnte diese Aufrechterhaltung der Netzwerkfunktion trotz signifikanter Reduktion von Nlgn2 für die tragende Rolle dieses Proteins sprechen. Bei der gewöhnlich vorhandenen Menge an Nlgn2 könnte es sich um eine Art Puffer handeln, sodass beispielsweise bei einem heterozygotem Funktionsausfall des Nlgn2 Gens die im Anschluss produzierte Menge von Nlgn2 trotzdem noch ausreicht, um eine suffiziente Netzwerkinhibition zu gewährleisten. Für künftige elektrophysiologische Experimente wäre ein konditionaler Knockout von Nöten, der die Protein Level von Nlgn2 im Hippocampus stärker reduziert, sodass Kompensationsmechanismen durch die Restmenge von Nlgn2 ausgeschlossen werden können. Dies könnte zum Beispiel durch andere Modelle der konditionalen Eliminierung von Nlgn2, wie die Injektion der AAV (= Adeno-assoziiertes Virus) exprimierenden Cre-Rekombinase versucht werden.^{63,96} Mithilfe dieses methodischen Ansatzes könnte zudem eine ortsspezifische Nlgn2 Elimination unternommen werden, welche die Untersuchung der Netzwerkfunktion des Gyrus Dentatus ohne Einflussnahme vernetzter Hirnregionen möglich machen würde.

Liang et al. konnten mithilfe dieses konditionalen Nlgn2 Knockout Modells zeigen, dass Nlgn2 für den Erhalt der inhibitorischen Synapse des medialen präfrontalen Cortex benötigt wird. Neben den elektrophysiologischen Auswirkungen konnte zudem ein Verlust inhibitorischer Synapsen im adulten Tier beobachtet werden, der allerdings erst sechs bis sieben Wochen nach konditionaler Eliminierung von Nlgn2 sichtbar wurde.⁹⁵ Troyano-Rodriguez et al. warteten auch mehr als sechs Wochen nach Injektion der AAV exprimierenden Cre-Rekombinase bis zur Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen. Auf Basis dieser

Daten sowie nicht publizierte Experimenten von Dilja Krueger Burg und ihrer Gruppe, entschieden wir uns für einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen zwischen Tamoxifen-Applikation und elektrophysiologischen Experimenten. Trotzdem könnte man vermuten, dieser Zeitraum reiche wohlmöglich nicht aus, um das bereits vorhandene Nlgn2 vollständig abzubauen, wenn man von einer Langlebigkeit dieses Proteins ausgeht. Aus anderen Daten geht jedoch eine relativ kurze Halbwertszeit sogenannter Zelladhäsionsproteine hervor, zu denen die meisten Neuroligine gezählt werden.¹⁰³ Wenn man die Halbwertszeit von Nlgn2 von circa fünf Tagen¹⁰³ beachtet, kann man die Bedenken bezüglich eines insuffizienten Proteinabbaus und möglicherweise zu kurzen Wartezeit zwischen Tamoxifen-Applikation und Experimenten verwerfen.

4.4 Ausblick

Bei der zeitspezifischen Deletion von Nlgn2 und Untersuchung der synaptischen Übertragung, Plastizität und neuronalen Exzitabilität im Gyrus Dentatus von adulten Mäusen zeigen sich differente Ergebnisse im Vergleich zu dem konventionellen Nlgn2 Knockout Modell. Die *in vivo* Erregbarkeit der Körnerzellen des Gyrus Dentatus sowie GABAerge Netzwerkinhibition bleibt im hier verwendeten konditionalen Nlgn2 Knockout Modell bei einer Proteinreduktion von Nlgn2 auf 41,07% im Hippocampus weitgehend unbeeinträchtigt. Die Limitationen der elektrophysiologischen Untersuchung sowie des verwendeten konditionalen Nlgn2 Knockout Modells wurden bereits ausführlich diskutiert und Verbesserungsvorschläge des methodischen Vorgehens aufgezeigt (siehe Kapitel 4.2.5 und 4.3). Um die Fragestellung nach der Rolle von Nlgn2 nach abgeschlossener Hirnentwicklung im Gyrus Dentatus zu beantworten, wäre ein konditionaler Nlgn2 Knockout hilfreich, welcher die Proteinmenge in der untersuchten Hirnregion effizienter reduziert. Dies sollte beispielsweise durch Western-Blotting Experimente vor Durchführung der elektrophysiologischen Versuchsreihe untersucht werden. Es werden in Zukunft weitere Experimente notwendig sein, um die Fragestellung dieser Dissertation abschließend zu klären. Es ist eine Ergänzung durch Experimente anzustreben, welche in nicht anästhesierten Tieren unter physiologischeren Bedingungen *in vivo* durchgeführt

werden oder die Aufnahmen einzelner Zellen mittels whole-cell patch-clamp *in vitro* oder *in vivo* ermöglicht. Um die Möglichkeit der Anpassung des Netzwerks beim Fehlen von Nlgn2 in künftigen Versuchsreihen zu beobachten oder Kompensationsmechanismen zu entlarven, ist die Kombination mit anderen methodischen Verfahren, beispielsweise immunhistochemischer Bildgebung, von Vorteil. Zudem haben sich Verhaltensexperimente in den bisherigen Untersuchungen konventioneller Nlgn2 Knockout Modelle als besonders aufschlussreich erwiesen,^{63,96} sodass über eine Ergänzung solcher Versuche nachgedacht werden sollte. Um insbesondere die hippocampale Funktion zu untersuchen, sollte kritisch abgewogen werden, ob Verhaltensexperimente wie beispielsweise der „Morris water maze“ oder „Context dependent fear conditioning“ hinzugezogen werden.¹⁰⁴

Eine Untersuchung der Nlgn2 Deletion im Gyrus Dentatus von Mäusen ist nicht nur aus Perspektive der Grundlagenforschung von großem Interesse. Bei allen translationalen Überlegungen sollte jedoch eine gewisse Vorsicht beachtet werden, da Netzwerkfunktionen einzelner Proteine nicht immer direkt übertragbar sind. Dies bestätigt die Funktion von Nlgn4, das in Mäusen an inhibitorischen Synapsen wirksam ist und im Menschen hingegen an exzitatorischen Synapsen seine Funktion einnimmt.¹⁰⁵ Bei konventioneller Nlgn2 Deletion wirkt sich dieser Knockout unmittelbar auf das Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition zugunsten der Exzitation im Gyrus Dentatus aus, was die klinische Relevanz dieser Forschung verdeutlicht.⁴⁹ Vor allem während der frühen Hirnentwicklung spielt das Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition, dem die Neurone unweigerlich ausgesetzt sind, eine große Rolle. An diesem Prozess ist das postsynaptische Adhäsionsprotein Nlgn2 maßgeblich beteiligt.¹⁰⁶ Änderungen dieses Verhältnisses zwischen Exzitation und Inhibition haben weitreichende Konsequenzen für die Funktion des Netzwerks und dienen auch als Erklärungsmodell für viele psychiatrische Erkrankungsbilder, wie beispielsweise Schizophrenie oder Autismus Spektrum Störungen.¹⁰⁷ Selten et al. diskutieren insbesondere die Bedeutung der inhibitorischen Funktionsstörungen bei psychiatrischen Erkrankungen, wovon bei einem Fehlen von Nlgn2 unmittelbar auszugehen ist.¹⁰⁸ Des Weiteren sprechen neuste Studien dafür, dass Nlgn2 an den zugrunde liegenden Mechanismen epileptischer Anfälle

maßgeblich mitbeteiligt ist.¹⁰⁹ Auch dem Gyrus Dentatus wird eine tragende Rolle bei der Entstehung von Epilepsien zugeschrieben.^{110,111} Es wird vermutet, dass der Gyrus Dentatus die sensiblen hippocampalen Strukturen vor einer Übererregung schützt. In einem Mausmodell für Temporallappenepilepsie konnte epileptische Aktivität mithilfe optogenetischer Hyperpolarisation von Körnerzellen unterdrückt und bei einer Exzitation der gleichen Zellen epileptische Anfälle provoziert werden.¹¹² Krook-Magnuson et al. beschreiben ausführlich die besondere Funktion der Körnerzellen, welche über verschiedene Mechanismen schwieriger zu erregen sind als andere Zellen und somit gegenüber epileptischer Aktivität eine protektive Wirkung aufweisen.¹¹² Es wäre außerdem interessant, dem Trend der Beeinträchtigung der Plastizität, welcher bei Untersuchung des Populationsspike-LTP ersichtlich wurde, in konventionellen Nlgn2 Knockout Mäusen nachzugehen. Es konnte bereits mehrfach die Bedeutung anderer Proteinen der Neuroligin Familie, wie beispielsweise Nlgn1, für die synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung nachgewiesen werden.^{91,113} Bisher konnten nur wenige Studien in Nlgn2 Knockout Mäusen eine Einschränkung der molekularen Mechanismen des Lernens und der Gedächtnisbildung aufweisen.⁴⁴ Klinische Studien lassen dies jedoch stark vermuten, da neben den psychiatrischen Auffälligkeiten auch eine Beeinträchtigung kognitiver Funktionen im Zusammenhang mit Nlgn2 festgestellt werden konnte.^{40,41,44}

5 Literaturverzeichnis

1. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
2. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-R1121.
3. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*. 5th ed. The McGraw-Hill Companies; 2013.
4. Trepel M. *Neuroanatomie: Struktur Und Funktion*. 6. ed. Elsevier; 2015.
5. Kahle W, Frotscher M, Schmitz F. *Taschenatlas Anatomie - Nervensystem Und Sinnesorgane*. 12th ed. Georg Thieme Verlag; 2018.
6. Rolls ET. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci*. 2013;7(74):1-21.
7. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287:1433-1438.
8. Wiebe S. Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 2000;27(1):S6-S10.
9. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971;34:171-175.
10. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436(7052):801-806.
11. Hartley T, Lever C, Burgess N, O'Keefe J. Space in the brain: How the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014;369(1635):1-18.
12. Striedter G, Northcutt R. *Brains Through Time: A Natural History of Vertebrates*. Oxford University Press; 2020.
13. Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007;163:3-22.
14. Hunsaker MR, Mooy GG, Swift JS, Kesner RP. Dissociations of the Medial and Lateral Perforant Path Projections Into Dorsal DG, CA3, and CA1 for Spatial and Nonspatial (Visual Object) Information Processing. *Behav Neurosci*. 2007;121(4):742-750.
15. Nilssen ES, Doan TP, Nigro MJ, Ohara S, Witter MP. Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial

- entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus*. 2019;29(12):1238-1254.
16. Bellmund JLS, Deuker L, Doeller CF. Mapping sequence structure in the human lateral entorhinal cortex. *Elife*. 2019;8:e458133.
 17. Tamamaki N, Nojyo Y. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*. 1993;3(4):471-480.
 18. Witter MP, Doan TP, Jacobsen B, Nilssen ES, Ohara S. Architecture of the entorhinal cortex a review of entorhinal anatomy in rodents with some comparative notes. *Front Syst Neurosci*. 2017;11(46):1-12.
 19. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Cell Physiol Biochem*. 1989;31(3):571-591.
 20. Soriano E, Frotscher M. Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus*. 1994;4(1):65-69.
 21. Ribak CE, Seress L, Amaral DG. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*. 1985;14(5):835-857.
 22. Foster M, Sherrington CS. Part Three: The Central Nervous System. In: *A Textbook of Physiology*. MacMillan & Co Ltd; 1897.
 23. Regehr WG. Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(7):1-19.
 24. Wu LG, Saggau P. Presynaptic Calcium Is Increased during Normal Synaptic Transmission and Paired-Pulse Facilitation, but Not in Long-Term Potentiation in Area CA1 of Hippocampus. *J Neurosci*. 1994;14(2):645-654.
 25. Hebb DO. *The Organization of Behavior*. 1st ed. New York: Wiley & Sons; 1949.
 26. Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232:331-356.
 27. Harris EW, Cotman CW. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl d-aspartate antagonists. *Neurosci Lett*. 1986;70(1):132-137.

28. Abraham WC. How long will long-term potentiation last? *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2003;358(1432):735-744.
29. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993;361(6407):31-39.
30. Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM, Reymann KG. Long-term potentiation in the hippocampus: Discovery, mechanisms and function. *Neuroforum.* 2018;24(3):163-185.
31. Lynch MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev.* 2004;84(1):87-136.
32. Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 1988;452(1-2):57-65.
33. Ichtchenko K, Nguyen T, Südhof TC. Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem.* 1996;271(5):2676-2682.
34. Krueger DD, Tuffy LP, Papadopoulos T, Brose N. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 2012;22(3):412-422.
35. Bang ML, Owczarek S. A matter of balance: Role of neurexin and neuroligin at the synapse. *Neurochem Res.* 2013;38(6):1174-1189.
36. Südhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature.* 2008;455(7215):903-911.
37. Jamain S, Quach H, Betancur C, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* 2003;34(1):27-29.
38. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, et al. X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. *Am J Hum Genet.* 2004;74(3):552-557.
39. Hörnberg H. Rescue of oxytocin response and social behaviour in a mouse model of autism. *Nature.* 2020;584(7820):252-256.
40. Sun C, Cheng MC, Qin R, et al. Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2011;20(15):3042-3051.

41. Heshmati M, Aleyasin H, Menard C, et al. Cell-type-specific role for nucleus accumbens neuroligin-2 in depression and stress susceptibility. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(5):1111-1116.
42. Blundell J, Tabuchi K, Bolliger MF, et al. Increased Anxiety-like Behaviour in Mice Lacking the Inhibitory Cell Adhesion Molecule Neuroligin 2. *Genes, Brain Behav*. 2009;8(1):114-126.
43. Babaev O, Botta P, Meyer E, et al. Neuroligin 2 deletion alters inhibitory synapse function and anxiety-associated neuronal activation in the amygdala. *Neuropharmacology*. 2016;100:56-65.
44. Parente DJ, Garriga C, Baskin B, et al. Neuroligin 2 nonsense variant associated with anxiety, autism, intellectual disability, hyperphagia, and obesity. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(1):213-216.
45. Varoqueaux F, Jamain S, Brose N. Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*. 2004;83(9):449-456.
46. Pouloupoulos A, Aramuni G, Meyer G, et al. Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron*. 2009;63(5):628-642.
47. Krueger-Burg D, Papadopoulos T, Brose N. Organizers of inhibitory synapses come of age. *Curr Opin Neurobiol*. 2017;45:66-77.
48. Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, et al. Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron*. 2006;51(6):741-754.
49. Jedlicka P, Hoon M, Papadopoulos T, et al. Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo. *Cereb Cortex*. 2011;21(2):357-367.
50. Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, et al. Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for β -neurexins. *Cell*. 1995;81(3):435-443.
51. Jedlicka P, Muellerleile J, Schwarzacher SW. Synaptic Plasticity and Excitation-Inhibition Balance in the Dentate Gyrus: Insights from in Vivo Recordings in Neuroligin-1, Neuroligin-2, and Collybistin Knockouts. *Neural Plast*. 2018;2018:1-11.
52. Papadopoulos T, Soykan T. The role of collybistin in gephyrin clustering at inhibitory synapses: Facts and open questions. *Front Cell Neurosci*. 2011;5(11):1-10.
53. Kang Y, Zhang X, Dobie F, Wu H, Craig AM. Induction of GABAergic

- postsynaptic differentiation by α -neurexins. *J Biol Chem*. 2008;283(4):2323-2334.
54. Hirao K, Hata Y, Ide N, et al. A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N- methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J Biol Chem*. 1998;273(33):21105-21110.
 55. Schweizer C, Balsiger S, Bluethmann H, et al. The γ 2 subunit of GABAA receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol Cell Neurosci*. 2003;24(2):442-450.
 56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–685.
 57. Cruces-solis H, Babaev O, Ali H, Chatain CP. Altered theta / beta frequency synchrony links abnormal anxiety-related behavior to synaptic inhibition in Neuroligin-2 knockout mice. *bioRxiv*. 2019.
doi:<https://doi.org/10.1101/726190>
 58. Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*. 2003;13(3):476-484.
 59. Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, et al. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods*. 2009;6(7):493-495.
 60. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445(7128):661-665.
 61. Kohan DE. Progress in gene targeting: Using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int*. 2008;74(4):427-437.
 62. Günschmann C, Chiticariu E, Garg B, et al. Transgenic mouse technology in skin biology: Inducible gene knockout in mice. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1-4.
 63. Liang J, Xu W, Hsu YT, Yee AX, Chen L, Südhof TC. Conditional neuroligin-2 knockout in adult medial prefrontal cortex links chronic changes in synaptic inhibition to cognitive impairments. *Mol Psychiatry*. 2015;20(7):850-859.
 64. Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. Academic Press; 2001.
 65. Herreras O. Local field potentials: Myths and misunderstandings. *Front Neural Circuits*. 2016;10(101):1-16.

66. Lenz M, Kruse P, Eichler A, et al. All-Trans Retinoic Acid induces synaptic plasticity in human cortical neurons Abbreviated title: Synaptic plasticity in human cortex. *bioRxiv*. 2020.
doi:<https://doi.org/10.1101/2020.09.04.267104>
67. Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 3rd ed. Springer Spektrum; 2012.
68. UniProt. UniProtKB - Q69ZK9 (NLGN2_MOUSE).
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q69ZK9>. Accessed December 19, 2020.
69. Daoudal G, Debanne D. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem*. 2003;10(6):456-465.
70. Bronzino JD, Abu-Hasaballah K, Austin-LaFrance RJ, Morgane PJ. Maturation of long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus of the freely moving rat. *Hippocampus*. 1994;4(4):439-446.
71. Jedlicka P, Deller T, Schwarzacher SW. Computational modeling of GABAA receptor-mediated Paired-pulse inhibition in the dentate gyrus. *J Comput Neurosci*. 2010;29(3):509-519.
72. Dugladze T, Maziashvili N, Börgers C, et al. GABAB autoreceptor-mediated cell type-specific reduction of inhibition in epileptic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):15073-15078.
73. Jahn HM, Kasakow C V., Helfer A, et al. Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-11.
74. Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol*. 2002;244(2):305-318.
75. Rotheneichner P, Romanelli P, Bieler L, et al. Tamoxifen activation of cre-recombinase has no persisting effects on adult neurogenesis or learning and anxiety. *Front Neurosci*. 2017;11(27):1-8.
76. Morine KJ, Qiao X, Paruchuri V, et al. Conditional knockout of activin like kinase-1 (ALK-1) leads to heart failure without maladaptive remodeling. *Heart Vessels*. 2017;32(5):628-636.
77. Mishiba T, Tanaka M, Mita N, et al. Cdk5/p35 functions as a crucial regulator of spatial learning and memory. *Mol Brain*. 2014;7(1):1-11.
78. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*. 2001;24(1):71-80.

79. Zhao J, Nassar MA, Gavazzi I, Wood JN. Tamoxifen-inducible NaV1.8-CreERT2 recombinase activity in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *Genesis*. 2006;44(8):364-371.
80. Furr BJA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther*. 1984;25(2):127-205.
81. Schwenk F, Kühn R, Angrand P-O, Rajewsky K, Stewart AF. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(6):1427-1432.
82. Denk F, Ramer LM, Erskine ELKS, et al. Tamoxifen induces cellular stress in the nervous system by inhibiting cholesterol synthesis. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3(1):74.
83. Chen D, Wu CF, Shi B, Xu YM. Tamoxifen and toremifene cause impairment of learning and memory function in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(1-2):269-276.
84. Zhang H, Xie M, Schools GP, et al. Tamoxifen mediated estrogen receptor activation protects against early impairment of hippocampal neuron excitability in an oxygen/glucose deprivation brain slice ischemia model. *Brain Res*. 2009;1247:196-211.
85. Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res*. 1995;703(1-2):26-30.
86. Liu Z, Cheng Y, Luan Y, et al. Short-term tamoxifen treatment has long-term effects on metabolism in high-fat diet-fed mice with involvement of Nmnat2 in POMC neurons. *FEBS Lett*. 2018;592(19):3305-3316.
87. Vogt MA, Chourbaji S, Brandwein C, Dormann C, Sprengel R, Gass P. Suitability of tamoxifen-induced mutagenesis for behavioral phenotyping. *Exp Neurol*. 2008;211(1):25-33.
88. Stifter SA, Greter M, Greter M. STOP floxing around: Specificity and leakiness of inducible Cre/loxP systems. *Eur J Immunol*. 2020;50(3):338-341.
89. Garcia E, Mills AA. Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(12):151-158.
90. Jedlicka P, Papadopoulos T, Deller T, Betz H, Schwarzacher SW. Increased network excitability and impaired induction of long-term

- potentiation in the dentate gyrus of collybistin-deficient mice in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2009;41(1):94-100.
91. Jung S-Y, Kim J, Bin Kwon O, et al. Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(10):4710-4715.
 92. Wigström H, Gustafsson B. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature.* 1983;301(5901):603-604.
 93. Hara K, Harris RA. The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effects on Neurotransmitter-Gated Ion Channels. *Anesth Analg.* 2002;94(2):313-318.
 94. Davis S, Bliss TVP, Dutrieux G, Laroche S, Errington ML. Induction and duration of long-term potentiation in the hippocampus of the freely moving mouse. *J Neurosci Methods.* 1997;75(1):75-80.
 95. Liang J, Xu W, Hsu YT, Yee AX, Chen L, Südhof TC. Conditional neuroligin-2 knockout in adult medial prefrontal cortex links chronic changes in synaptic inhibition to cognitive impairments. *Mol Psychiatry.* 2015;20(7):850-859.
 96. Troyano-Rodriguez E, Wirsig-Wiechmann CR, Ahmad M. Neuroligin-2 Determines Inhibitory Synaptic Transmission in the Lateral Septum to Optimize Stress-Induced Neuronal Activation and Avoidance Behavior. *Biol Psychiatry.* 2019;85(12):1046-1055.
 97. Pernía-Andrade AJ, Jonas P. Theta-Gamma-Modulated Synaptic Currents in Hippocampal Granule Cells InVivo Define a Mechanism for Network Oscillations. *Neuron.* 2014;81(1):140-152.
 98. Kowalski J, Gan J, Jonas P, Pernía-Andrade AJ. Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern in vivo in anesthetized rats. *Hippocampus.* 2016;26(5):668-682.
 99. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, et al. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science.* 2007;318(5847):71-76.
 100. Budreck EC, Scheiffele P. Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci.* 2007;26(7):1738-1748.

101. Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(3):1100-1105.
102. Hammer M, Krueger-Burg D, Tuffy LP, et al. Perturbed Hippocampal Synaptic Inhibition and γ -Oscillations in a Neuroligin-4 Knockout Mouse Model of Autism. *Cell Rep*. 2015;13(3):516-523.
103. Dörrbaum AR, Kochen L, Langer JD, Schuman EM. Local and global influences on protein turnover in neurons and glia. *Elife*. 2018;7:e34202.
104. Gerlai R. Behavioral tests of hippocampal function: Simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res*. 2001;125(1-2):269-277.
105. Ali H, Marth L, Krueger-Burg D. Neuroligin-2 as a central organizer of inhibitory synapses in health and disease. *Sci Signal*. 2020;13(663):1-13.
106. Levinson JN, El-Husseini A. Building Excitatory and Inhibitory Synapses: Balancing Neuroligin Partnerships. *Neuron*. 2005;48(2):171-174.
107. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain Behav*. 2003;2(5):255-267.
108. Selten M, van Bokhoven H, Nadif Kasri N. Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders. *F1000Research*. 2018;7(23):1-16.
109. Cao F, Liu JJ, Zhou S, et al. Neuroligin 2 regulates absence seizures and behavioral arrests through GABAergic transmission within the thalamocortical circuitry. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-15.
110. Heinemann U, Beck H, Dreier JP, Ficker E, Stabel J, Zhang CL. The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;7:273-280.
111. Lothman EW, Stringer JL, Bertram EH. The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;7:301-313.
112. Krook-Magnuson E, Armstrong C, Bui A, Lew S, Oijala M, Soltesz I. In vivo evaluation of the dentate gate theory in epilepsy. *J Physiol*. 2015;593(10):2379-2388.
113. Kim J, Jung SY, Yeon KL, et al. Neuroligin-1 is required for normal expression of LTP and associative fear memory in the amygdala of adult

animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):9087-9092.