

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Rutkowski

Morphologische Veränderungen von Neuronen beim Rubinstein-Taybi-Syndrom anhand eines Mausmodells

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Lynhda Nguyen
aus Bremen

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.09.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Chi-un Choe

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Ulrich Schüller

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Rubinstein-Taybi-Syndrom	1
1.1.1 Klinik und Symptome.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.2 CREB-binding Protein (CBP)	3
1.2.1 Struktur und Funktion	3
1.2.2 Rolle in der Onkologie	4
1.2.3 Rolle in der neuronalen Entwicklung	5
1.3 Neuronale Morphologie.....	6
1.3.1 Der Neokortex	6
1.3.2 Die Pyramidenzelle	9
1.3.3 Die dendritischen Dornfortsätze	11
1.3.3.1 Aufbau, Funktion und Plastizität	11
1.3.3.2 Spinogenese.....	13
1.4 Neuronale Morphologie und mentale Retardierung	15
1.4.1 Zusammenhang von CBP-Mutationen und mentaler Retardierung	15
1.4.2 Zusammenhang von Morphologie und mentaler Retardierung	15
1.4.3 Morphologie beim Rubinstein-Taybi-Syndrom	16
2. Hypothese und Zielsetzung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Tierversuche	19
3.1.1 hGFAP ^{cre} ::CBP ^{F1/F1} transgenes Maus-Modell	19
3.1.2 Genotypisierung der Mäuse	20
3.1.3 Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur	21
3.2 Färbemethoden.....	25
3.2.1 Immunhistochemie	25
3.2.2 Golgi-Cox-Färbung.....	26
3.3 Statistische Analyse	27

4. Ergebnisse	28
4.1. Versuchstiere mit CBP-Defizienz zeigten strukturelle Veränderungen im Gehirn	28
4.2 Morphologie der pyramidalen Dendriten	29
4.2.1 Die apikalen Dendriten der CBP-mutierten Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V sind signifikant verkürzt.....	29
4.2.2 Die Anzahl der sekundären Dendriten ist bei CBP-defizienten Pyramidenzellen unverändert.....	30
4.2.3 Die Richtung und Orientierung der apikalen Dendriten ist bei CBP-Defizienz unverändert.....	31
4.3 Morphologie der dendritischen Dornfortsätze	33
4.3.1 Die Dichte der Dornfortsätze von Pyramidenzellen ist bei einer CBP-Mutation signifikant reduziert.....	33
4.3.2 Pyramidenzellen mit CBP-Defizienz der kortikalen Lamina V zeigen Alterationen in der Morphologie der Dornfortsätze	34
4.4 Morphologie der CBP-defizienten Neurone in der Zellkultur	35
4.4.1 Die Länge der neuronalen Dendriten ist bei einer CBP-Defizienz unverändert	36
4.4.3 Der Anteil an ausgebildeten apikalen Dendriten ist unter den CBP-defizienten Neuronen signifikant erniedrigt	39
5. Diskussion	41
5.1 Das hGFAP-cre::cbp ^{F1/F1} -Mausmodell für das Rubinstein-Taybi-Syndrom	41
5.2 Die Rolle des CBP in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung.....	41
5.2.1 CBP als Regulator der neuronalen Struktur	41
5.2.2 Die Ausbildung und Ausreifung der Spines sind abhängig von CBP	43
5.3 Implikationen für die Pathogenese des Rubinstein-Taybi-Syndroms.....	45
5.3.1 Mikrostrukturelle Veränderungen als Ursache der mentalen Retardierung und kognitiven Dysfunktion.....	45
5.3.2 Die mentale Retardierung ist abhängig von der CBP-vermittelten Morphogenese	46
5.3 Ausblick.....	47

6. Zusammenfassung	49
7. Summary	50
8. Literaturverzeichnis	51
9. Abbildungsverzeichnis	73
10. Tabellenverzeichnis	74
11. Abkürzungsverzeichnis	75
12. Danksagung	77
13. Lebenslauf	78
14. Eidesstattliche Erklärung	78

1. Einleitung

1.1 Das Rubinstein-Taybi-Syndrom

Das Rubinstein-Taybi-Syndrom (OMIM #180849, #613684) ist eine hereditäre Erkrankung, die mit einer mentalen Retardierung, einer Mikrozephalie, postnatalen Wachstumsdefizienz, fazialen Anomalien sowie Vorkommen von breiten Daumen und Zehen charakterisiert ist [1]. Die offizielle Abkürzung des Rubinstein-Taybi-Syndroms lautet RSTS, jedoch wird in der Literatur häufig die Bezeichnung RTS verwendet.

Es handelt sich um eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 1:100.000 bis 1:125.000 [2]. Padfield et al. (1968) schätzen die Häufigkeit des Rubinstein-Taybi-Syndroms unter den Patienten mit einer mentalen Retardierung auf 1:300 bis 1:500 [3].

Die Diagnose von RSTS wird klinisch gestellt. Neben den typischen äußeren Merkmalen und der mentalen Retardierung können in 40 – 60 % der Fälle Mutationen im *cyclic AMP-response element binding protein (CREB) binding protein (CBP)* und 3 – 8 % der Fälle im stark homologen *adenovirus early region 1A (E1A)-assoziiertem Protein (p300)* nachgewiesen werden [4-6]. Die Ursachen für die restlichen 30 – 50 % der Fälle sind noch Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

1.1.1 Klinik und Symptome

Das Rubinstein-Taybi-Syndrom präsentiert sich klinisch mit einer unterschiedlich stark ausgeprägten Intelligenzminderung sowie variabel ausgeprägten breiten Daumen und Zehen [1, 6]. Vor allem Patienten mit *p300*-Mutationen haben i.d.R. normal geformte Phalangen [7, 8]. Neben diesen charakteristischen Symptomen weisen die Patienten zahlreiche weitere morphologische und organische Auffälligkeiten auf.

Betroffene fallen schon im Neugeborenenalter bzw. in der frühen Kindheit mit fazialen Dysmorphien auf [9]. Die veränderten Gesichtszüge zeichnen sich durch eine Mikrozephalie, einen abfallenden Lidachsenverlauf, lange Wimpern, einen breiten Nasenrücken, eine Schnabelnase mit verbreitetem Nasenseptum, ein stark gewinkeltes Palatum und eine leichte Mikrognathie aus [10-13]. Säuglinge leiden an Atembeschwerden, rezidivierenden Infekten und schweren Obstipationen [9].

Während das pränatale Wachstum physiologisch ist, fällt die Perzentilenkurve für die Körpergröße, das Körpergewicht und den Kopfumfang rapide in den ersten Lebensmonaten [9]. Im Erwachsenenalter fallen die Patienten unter die altersgerechte, durchschnittliche Körpergröße [9]. Weiterhin sind Hautanomalien, kongenitale oder juvenile Glaukome, angeborene Herzfehler (v.a. Atrium- und Ventrikelseptumdefekt, persistierender Ductus arteriosus Botalli), Nierenfehlbildungen sowie Hypospadie typische Befunde [9, 10, 14-16].

Patienten mit RSTS haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines benignen oder malignen Tumors, v.a. vom embryonalen und neuronalen Ursprung [17]. In Fällen mit RSTS wurden unter anderem Neuroblastome, Medulloblastome und Meningiome berichtet [6, 17]. RSTS-Patienten haben eine angeborene, moderate bis schwere Intelligenzminderung, die je nach Studie von < 25 bis 79 IQ-Punkten reicht [6, 14]. Ob diese Intelligenzminderung während des Alterns fortschreitet, wird derzeit noch diskutiert [6]. Trotz der mentalen Retardierung (engl. intellectual disability, ID) weisen die Patienten in der Regel intakte soziale Fähigkeiten auf. Jedoch fällt deren Verhalten durch eine kurze Aufmerksamkeitsspanne auf. Im frühen Erwachsenenalter treten oft plötzliche Stimmungsschwankungen auf, die sich mit dem Alter häufen [18].

1.1.2 Ätiologie

Der Großteil der RSTS-Fälle resultiert aus de novo-Mutationen, wobei ein autosomal-dominanter Charakter beobachtet wird [4, 19, 20]. RSTS wird mit Chromosom 16p13.3 in Verbindung gebracht [21-24]. Petrij et al. (1995) zeigten, dass der Bruchpunkt auf Chromosom 16p13.3 auf die Region begrenzt ist, die für das humane cyclic AMP-response element binding protein (CREB) binding protein (kurz CREBBP oder CBP) kodiert [5]. Mit 40 – 60 % macht das *CBP*-Gen den größten Anteil aller verursachenden Gene aus [9]. Ein weiteres Gen ist das *E1A-associated protein P300* (kurz *p300*), das in 3 – 8 % aller untersuchten RSTS-Fälle gefunden wurde [9]. In 32 – 57 % der Fälle bleibt die Ursache unbekannt.

Nach der Human Gene Mutation Database (HGMD, Qiagen Bioinformatics) machen Punktmutationen, Mikrodeletionen und -insertionen rund 60 % aller gemeldeten *CBP*-Mutationen aus, wodurch ein vorzeitiger Translationsstopp mit einem verkürztem Produkt entsteht [5, 25]. Der geringere Teil wird durch Splicing sowie großen Deletionen, Insertionen und Translokationen verursacht [5, 25]. Studien

zeigten, dass die RSTS-verursachenden Mutationen nicht gleichmäßig innerhalb des *CBP*-Gens verteilt sind, sondern vor allem in der KAT (lysine acetyltransferase)-Domäne-kodierenden Region vorzufinden sind (siehe 1.2.1) [5, 6, 25, 26].

Vergleicht man RSTS-Patienten mit und ohne pathogenen Varianten des *CBP*-Gens, so finden sich keine signifikanten Unterschiede in den kongenitalen Anomalien, den fazialen Dysmorphien und der Entwicklung von Tumoren [27]. RSTS-Fälle mit großen Deletionen tendierten zu ausgeprägteren kognitiven Retardierungen, die sich jedoch nicht signifikant unterschieden [27]. Mosaik-Mikrodeletionen scheinen einen milderen Phänotyp zu verursachen als nicht-Mosaik-Deletionen [27, 28]. RSTS-Patienten mit einer Mutation im p300-kodierenden Gen tendieren zu einem milderen Phänotyp. Insbesondere die skelettalen Befunde sind weniger beeinträchtigt, einige Patienten haben unauffällige Hände und Füße. Ebenso ist die intellektuelle Entwicklung weniger eingeschränkt. Berichten zufolge weisen die Betroffenen eine normale bis moderat geminderte Intelligenz auf [29-32]. Ajmone et al. (2018) konnten zeigen, dass neuroradiologische Befunde in Magnetresonanztomografie (MRT)-Aufnahmen bei RSTS-Patienten mit *KAT*-Mutationen assoziiert sind [33].

1.2 CREB-binding Protein (CBP)

1.2.1 Struktur und Funktion

CBP und das homologe p300 sind ubiquitär exprimierte Proteine, die als transkriptionelle Co-Aktivatoren und Lysin-Acetyltransferasen (KAT) agieren und bekannt sind für ihre Rolle in der Embryonalentwicklung, im Zellwachstum und in der Zelltransformation (siehe 1.2.3) [34-36].

CBP und p300 sind homolog aufgebaut und teilen sich ähnliche Funktionen, weshalb sie in der Literatur oft als funktionelle Homologen zusammengefasst werden (Abb.1) [36-38]. Das *CBP*-Gen liegt auf Chromosom 16p13.3, das das 2442 Aminosäuren lange Protein CBP kodiert [39, 40]. Es kann in Bezug auf seine funktionelle Struktur in eine Protein-bindende Domäne, eine Lysin-Acetyltransferase (KAT)-Domäne und eine Transaktivierungsdomäne unterteilt werden [6]. Als Histon-Acetyltransferasen sind sowohl CBP als auch p300 an der Regulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren beteiligt [41-43]. Mit der intrinsischen

HAT-Aktivität bindet CBP an die Histone H3 und H4, wodurch die Chromatin-Struktur dekomprimiert wird [6, 41, 43]. Sein Name bezieht sich auf die erst beschriebene Fähigkeit des Proteins den Transkriptionsfaktor CREB zu binden [35, 44]. Mittlerweile sind mehr als 400 weitere Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine bekannt, die mit CBP interagieren, u.a. p53 [45, 46].

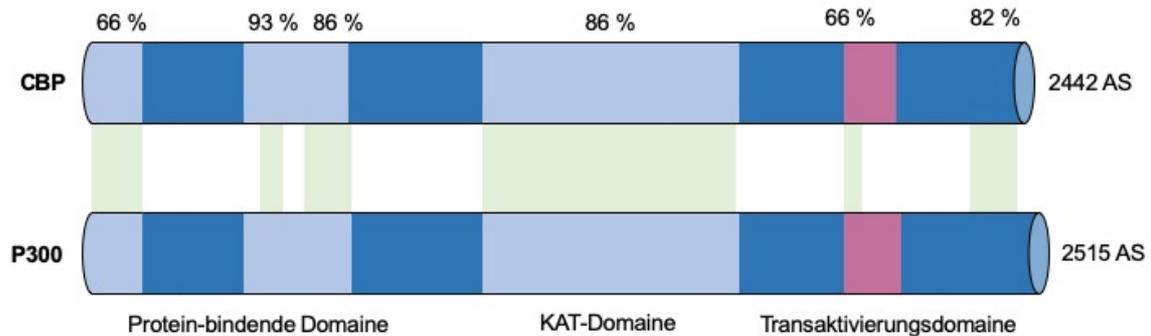


Abbildung 1: CBP und P300 sind homologe transkriptionelle Co-Aktivatoren mit KAT-Aktivität. Dargestellt ist die Homologie der Proteine CBP und P300. CBP besteht aus 2442 Aminosäuren, P300 besitzt 2515 Aminosäuren. Die Prozentzahlen geben den Anteil der gemeinsamen Aminosäuren der beiden Proteine an. Unten sind die Domänen der Enzyme beschriftet. Die Abbildung ist adaptiert an der Abbildung 2a aus Roelfsema, J.H. and D.J. Peters, Rubinstein-Taybi syndrome: clinical and molecular overview. *Expert Rev Mol Med*, 2007. **9**(23): p. 1-16.

1.2.2 Rolle in der Onkologie

Sowohl CBP als auch p300 werden als Tumorsuppressoren bezeichnet [35, 47]. *CBP*-Mutationen wurden in zahlreichen Malignomen berichtet. Somatische Translokationen t(8;16), die das *CBP*-Gen betreffen, sind mit der akuten myeloischen Leukämie und anderen hämatologischen Malignitäten assoziiert [39, 48]. Mutationen, die die KAT-Domäne betreffen, führen u.a. zur Ausbildung von B-Zell-Lymphomen [49, 50]. Bezüglich der soliden Tumore haben Merk et al. (2018) eine Assoziation von Mutationen im Chromosom 16p13 mit der Entwicklung eines Medulloblastom beschrieben [51]. Diese Befunde sind vereinbar mit der Beobachtung bei RSTS-Patienten, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Tumoren aufweisen, v.a. von embryonalen und neuronalen Tumoren.

Es wird derzeit diskutiert, ob der Defekt des *CBP*-Gens die einzige Ursache für die Entstehung der Tumore beim RSTS ist. Aufgrund der niedrigen Prävalenz ist es

schwer, Tumorgewebe von RSTS-Patienten zu erhalten. Proben könnten eine Untersuchung auf eine zweite, somatische Inaktivierung des *CBP*-Gens ermöglichen [6]. Somatische Inaktivierungen in Tumoren, die ein typisches Kennzeichen von Tumorsuppressor-Aktivitäten sind, müssten bei RSTS-Patienten noch untersucht werden [6]. Wahrscheinlich beruht die Tumorgenese, wie viele andere Befunde beim RSTS, auf der verminderten KAT-Aktivität [6].

1.2.3 Rolle in der neuronalen Entwicklung

Die frühe Letalität von *CBP*-Knockout-Mäusen im Embryonalalter aufgrund einer Fehlbildung des Neuralrohrs verhinderte eine genaue Untersuchung der Funktion des CBP hinsichtlich der neuronalen Entwicklung und Ausreifung [52-54]. Wurde *CBP* jedoch in bereits ausgereiften Neuronen von postnatalen Gehirnen eliminiert, so zeigten sich keine erheblichen neuronalen Defekte oder Dysmorphien [55, 56]. Jedoch wurden eingeschränkte Erinnerungsfähigkeiten beobachtet [55, 57, 58]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass CBP nicht nur einen bedeutenden Einfluss auf die korrekte Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) hat, sondern auch eine wichtige Rolle in der Funktion von ausgereiften Neuronen spielt [51, 56, 59-62]. *CBP*^{+/-}-heterozygote Mäuse sind aufgrund ihres postnatalen Überlebens geeigneter für die Untersuchung der Funktion von CBP und ähneln dem RSTS genetisch und phänotypisch am ehesten [53, 60, 63, 64]. Sowohl im Mausmodell als auch bei RSTS-Patienten führt ein heterozygoter Verlust von *CBP* zu einer Mikrozephalie, einer zerebellären Hypoplasie, einem kleineren Corpus callosum und einem reduziertem Volumen des Bulbus olfactorius [33, 43, 65, 66]. Es ist bekannt, dass CBP an der Regulation der Differenzierung von neuronalen Zellen, u.a. von Motoneuronen, kortikalen Progenitoren und Astrozyten, beteiligt ist [34, 51, 56, 59, 67-69]. Nach der zellulären Differenzierung ist CBP vor allem für die Aktivierung von Genen wichtig, die für das Wachstum von neuronalen Dendriten, die Ausreifung von dendritischen Dornfortsätzen und die aktivitätsabhängigen synaptischen Veränderungen verantwortlich sind [70]. Weiterhin haben Studien gezeigt, dass CBP für die Migration von verschiedenen neuronalen Zelltypen in den kortikalen, hippocampalen, zerebellären und spinalen neuronalen Schaltkreis benötigt wird [51, 56, 61, 67, 68]. Die Genexpression von CBP nimmt im Laufe der Entwicklung ab [56]. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung von anderen

epigenetischen Enzymen, deren relative Bedeutung mit dem Progress der Differenzierung abzunehmen scheint [71, 72].

1.3 Neuronale Morphologie

1.3.1 Der Neokortex

Der Neokortex ist der Sitz hoher kognitiver Funktionen und ist v.a. in Säugetieren ausgeprägt ausgebildet [73]. In Nagetieren entsteht etwa am 9. – 9.5 Gestationstag (E9 – E9.5) das sogenannte Neuralrohr, ein Produkt der Gastrulation des Ektoderms, aus dem sich das Gehirn und das Rückenmark differenzieren [74]. Dieser als Neurulation bezeichnete Prozess ist der erste Schritt der Entwicklung des ZNS der Vertebraten [74, 75].

Die Neokortizes der Säugetiere weisen im Aufbau eine große Ähnlichkeit auf. Jedoch können zwei Typen von Säugetieren bezüglich der kortikalen Oberfläche unterschieden werden: Spezies mit lissencephalischen Kortizes, die eine glatte Oberfläche aufweisen, und solche mit gyrencephalische Kortizes, die zahlreiche Windungen mit Sulci und Gyri bilden [76]. Die relative Dicke des Neokortex unterscheidet sich zwischen den Spezies der Säugetiere nur gering [73]. Der Neokortex besteht aus einer äußeren grauen Substanz, die ein Netzwerk aus glutamatergen und Gamma-Aminobuttersäure-assoziierten (GABAergen) Neuronen sowie Gliazellen und Blutgefäßen bildet [73]. Unter dem Kortex befindet sich die weiße Substanz bestehend aus den myelinisierten Axonen der Neurone der superfiziellen Schicht [73]. Der Kortex als Ganzes lässt sich in verschiedene funktionelle Regionen gliedern [77]. In der vertikalen Organisation lässt sich der Kortex in Kolumnen einteilen, die als funktionelle Mikroeinheiten arbeiten und durch Neuronen miteinander verbunden sind [78, 79]. In der horizontalen Dimension wird der zerebrale Kortex von innen nach außen in die Lamina I bis VI unterteilt, die sich in ihren Zelltypen und konnektiven Mustern unterscheiden [80].

Die Laminierung des Neokortex aus sechs Schichten bzw. Laminae wurde erstmals von dem Anatomen Brodmann (1909) beschrieben [77]. Zuvor wurden die Laminae von Ramon y Cajal mit der Golgi-Färbung dargestellt und abgebildet [77, 81]. Jede Lamina zeichnet sich durch eine charakteristische Verteilung von Zellen aus, die sich in ihrer Dichte, Form, Größe sowie ihrem Konnektivitätsmuster unterscheiden

[82]. Beispielsweise bilden Pyramidenzellen der Lamina V und VI (die infragranulären Laminae) weitläufige Verbindungen zu subkortikalen Strukturen, während die darüberliegenden Laminae I-IV (die supragranulären Laminae) vorwiegend ipsi- oder kontralaterale kortikokortikale Verbindungen ausüben [83, 84]. Inwiefern die sechsschichtige Laminierung eine Rolle in ihren kortikalen Konnektionen und ihrem neuronalen Schaltkreis spielt, ist noch unbekannt.

Die Lamina I (Stratum moleculare, L1) ist die Schicht direkt unter der Pia mater und beinhaltet ein locker aufgebautes Netzwerk aus vereinzelt Neuronen und Gliazellen sowie Anteile apikaler Dendriten von Pyramidenzellen der darunterliegenden Laminae und Axone, die L1 mit den anderen neokortikalen Arealen und dem Thalamus verbinden [85-87]. L1 ist bekannt für ihre wichtige Rolle in der neokortikalen Entwicklung [88]. Jedoch ist ihre Funktion im neokortikalen Kreislauf noch weitgehend unbekannt [88]. Eines der erst beschriebenen, kortikalen Zelltypen, die von Ramon y Cajal und Magnus Gustaf Retzius untersucht und definiert wurde, ist die Cajal-Retzius-Zelle [89]. Die Cajal-Retzius-Zellen sind unter den ersten Zellen, die während der Entwicklung des Kortex gebildet werden und durch Expression von Reelin eine bedeutende Rolle für die kortikale Laminierung spielen [86, 90-93]. Jedoch sind sie nur vorübergehend im Kortex vorzufinden und im Kortex von Nagetieren ab dem postnatalen Tag 11 (P11) nicht mehr nachzuweisen [94]. In den Laminae II und III (Stratum granulosum externum, L2 und Stratum pyramidale externum, L3) befinden sich kleine, dicht gepackte Somata von Sternzellen und Pyramidenzellen sowie Axone von Pyramidenzellen intrakortikaler Projektionen, hauptsächlich aus der Lamina V [84, 95-97]. Die Sternzellen exprimieren Reelin und bilden verästelte Dendriten aus [98-102]. Innerhalb des lokalen Verbundes bilden die beiden Zelltypen ausgeprägte Netzwerke aus: Die Pyramidenzellen sind mithilfe von Interneuronen miteinander verbunden, während die Sternzellen durch Parvalbumin- und Somatostatin-positive Zellen miteinander kommunizieren [98]. Die zwei Subnetzwerke sind jedoch nicht völlig unabhängig voneinander. Winterer et al. (2017) haben festgestellt, dass bis zu 14 % der Pyramidenzellen Signale an die Sternzellen vermitteln [101]. Die Lamina IV (Stratum granulosum internum, L4) ist eine dünne aber dicht gepackte kortikale Schicht, die aus Somata von Sternzellen und Pyramidenzellen besteht [103, 104]. Jedoch variiert ihre zelluläre Architektur zwischen kortikalen Arealen [105, 106]. In sensorischen Arealen dominieren die Sternzellen, während in anderen

kortikalen Regionen gehäuft die Pyramidenzellen aufzufinden sind [105]. Zellen der L4 erhalten direkt sensorische Input-Aktivitäten aus dem Thalamus und sind die erste Anlaufstelle für die kortikale Verarbeitung sensorischer Signale [97, 105, 107]. Von dort werden die Informationen hauptsächlich zu den Zellen der L2/ 3 und anschließend in den infragranulären Laminae weitergeleitet [97, 108, 109]. Die Lamina V (Stratum pyramidale internum, L5) ist die größte kortikale Schicht. Ihre großen und locker verteilten Pyramidenzellen sind die visuell auffälligsten Neurone im Kortex [110]. Ein Charakteristikum von L5 ist die Vielfalt ihrer Pyramidenzellen, die ihre langen Dendriten in andere kortikale Schichten und subkortikalen Strukturen projizieren [105, 111-114]. Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass Lamina V primär eine Output-Schicht ist, stellten weitere Studien fest, dass ihre Pyramidenzellen auch thalamokortikale Input-Signale erhalten und allein durch Aktivitäten des Thalamus angetrieben werden können, so dass Lamina V auch als wichtige Input-Schicht angenommen wird [115-121]. Diese anatomische Gegebenheit macht die Lamina V zur primären kortikalen Schicht, die in der Top-Down-Kontrolle anderer Hirnareale involviert ist [121]. Pyramidenzellen der Lamina V erhalten zudem Signale aller anderen kortikalen Schichten und sind folglich in allen afferenten Signalwegen im Kortex integriert [122]. Die Lamina VI (Stratum multiforme, L6) wird aus dicht gepackten, kleinen, runden Zellsomata, die meist Pyramidenzellen angehören, gebildet [123]. Die L6-Zellen erhalten direkt thalamokortikalen Input, so dass sie nach den L4-Zellen als wichtige Input-Lamina gilt [123]. Weiterhin senden sie wichtige Output-Aktivitäten in die Nuclei thalami und mithilfe langer Axone vermitteln sie Signale auf lokaler Ebene in die darüber liegenden Laminae und in andere kortikale Areale [123].

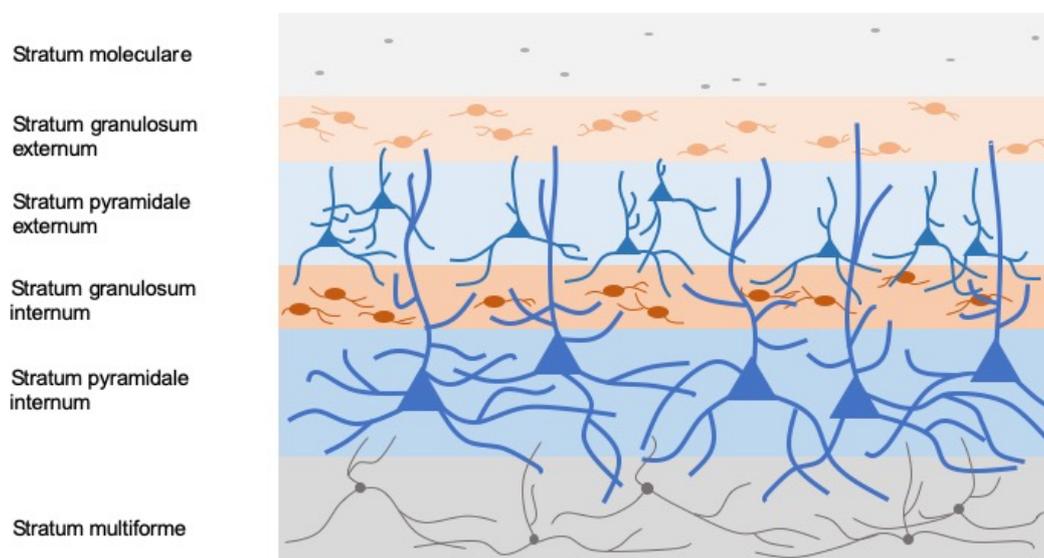


Abbildung 2: Schematische Darstellung der kortikalen Laminae und ihrer Zellen im Golgi-Cox-gefärbten Gewebeschnitt. Der Neokortex besteht aus sechs Schichten: In Golgi-Cox-imprägnierten Schnitten sind im Stratum moleculare (L1) vereinzelte Gliazellen zu sehen. Im Stratum granulosum externum (L2) und Stratum pyramidale externum (L3) werden Stern- und Pyramidenzellen sowie dendritische, intrakortikale Projektionen der darunterliegenden Schichten, hauptsächlich aus der L5, eingefärbt. Im Stratum granulosum internum (L4) werden hauptsächlich kleine Neuronen dargestellt. Das Stratum pyramidale internum (L5) präsentiert sich mit ihren prominenten Pyramidenzellen als größte kortikale Schicht. Die langen apikalen Dendriten der L5-Pyramidenzellen projizieren bis in die oberen Laminae. Im Stratum multiforme werden kleine, runde Somata gefärbt, die meist Pyramidenzellen angehören. Die Abbildung ist angelehnt an die Abbildung in *Ramon y Cajal, S. „Comparative study of the sensory areas of the human cortex“, Worcester Verlag, England, 1899, S. 363.*

1.3.2 Die Pyramidenzelle

Die kortikale Verarbeitung von Informationen beruht auf der Interaktion zwischen verschiedenen neuronalen Zelltypen in unterschiedlichen kortikalen Schichten und Arealen [124]. Pyramidenzellen finden sich reichlich in den Laminae II – VI des zerebralen Kortex in nahezu allen bisher untersuchten Säugetieren [125, 126]. Pyramidenzellen sind exzitatorische Neurone und machen mit einem Anteil von 70 – 85% die größte Population der Neurone im Kortex aus [122, 126-129]. Dieser Befund deutet darauf hin, dass deren Kernfunktion hochkonserviert ist und deren Existenz im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle für den Organismus spielt [130]. Pyramidale Neurone sind im Prosencephalon der meisten Säugetiere, inklusive des zerebralen Kortex, des Hippocampus und der Amygdala, nicht aber im Bulbus olfactorius, im Mittelhirn, im Rhombencephalon und im Rückenmark [89]. Somit sind sie vor allem in Hirnstrukturen aufzufinden, die mit höheren kognitiven Funktionen assoziiert sind [130]. Ein Verständnis der Funktion von Pyramidenzellen ist daher notwendig, um die grundlegende neuronale Funktion zu verstehen.

Pyramidenzellen sind charakterisiert durch einen apikalen und basalen Dendritenbaum sowie den pyramidenförmigen Soma (Abb. 3). Sie besitzen relativ kurze basale Dendriten. Der primäre, apikale Dendrit gabelt sich auf variabler Höhe auf bevor er sich am distalen Ende in einen Geäst aus zahlreichen weiteren Dendriten verzweigt. Von dem primären Dendriten zweigen sich sekundäre Dendriten in unterschiedlichen Winkeln ab [130]. Sowohl die basalen als auch die apikalen Dendriten sind von zahlreichen Dornfortsätzen (engl. Spines) bedeckt

[126]. Diese sind feine, membranöse Vorwölbungen auf neuronalen Oberflächen und stellen die postsynaptische Seite der exzitatorischen, glutamatergen Synapsen dar (siehe 1.5.3) [131-133].

Diese Charakteristika der Pyramidenzellen können stark zwischen kortikaler Schicht, Hirnregion und Spezies variieren (Abb. 3) [134, 135]. Beispielsweise sind Pyramidenzellen der Lamina V größer und besitzen längere apikale Dendriten und weniger sekundäre Verzweigungen als die Pyramidenzellen der Laminae II/ III [130].

Das Ausmaß der Ausreifung von Pyramidenzellen ist in der zweiten postnatalen Woche am größten [136-138]. Zwischen der ersten und zweiten postnatalen Woche verläuft das Wachstum der Pyramidenzellen in den oberflächlichen und tiefen kortikalen Schichten am schnellsten [136]. Hier verdoppelt sich die Dendritenlänge im Zeitraum vom P6 – 8 bis P13 – 16 [136].

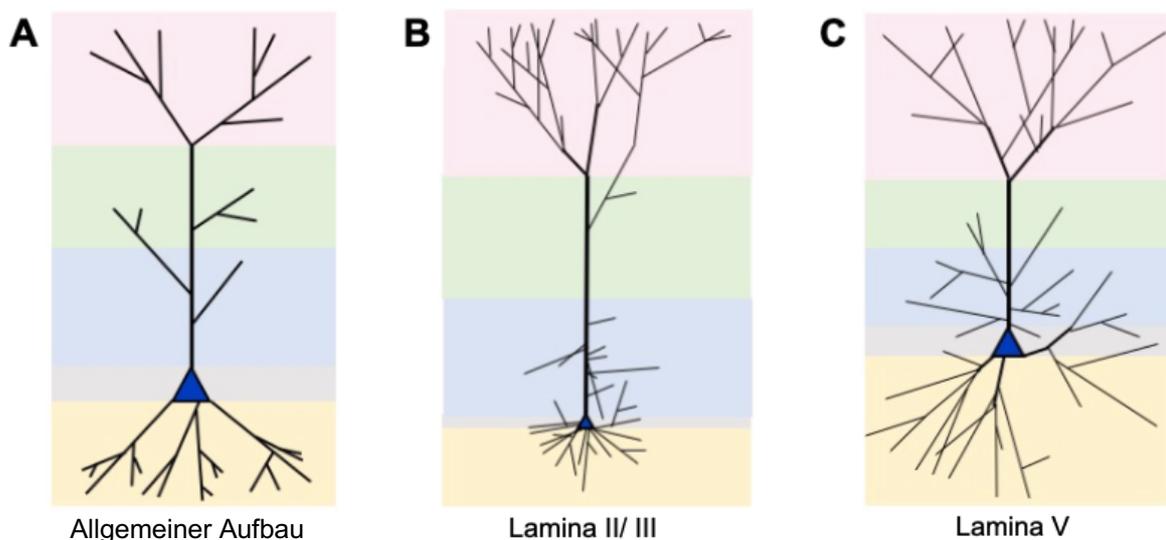


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pyramidenzellen aus den kortikalen Laminae II/ III und V. (A) Allgemeiner Aufbau einer Pyramidenzelle. (B) Pyramidenzelle aus L2/ 3. (C) Pyramidenzelle aus L5. Die Pyramidenzelle besteht aus einem pyramidenförmigen Soma (mit einem grauen Hintergrund hervorgehoben) und gibt basale Äste (gelber Hintergrund) sowie einen apikalen Dendriten ab, der sich nochmals in einen proximalen (blauer Hintergrund) und einen distalen Teil (grüner Hintergrund) einteilen lässt. Zwischendurch gibt der Hauptast sekundäre Dendriten ab, die wiederum Dendriten ausbilden. Am distalen Ende kann sich der apikale Dendrit in zwei Äste verzweigen, die dann einen Büschel an zahlreichen weiteren Ästen exprimieren (rosa Hintergrund). Pyramidenzellen der L5 sind i.d.R. größer und besitzen einen komplexeren Dendritenbaum als die der L2/ 3. Mit ihren langen apikalen Dendriten reichen sie bis in die oberen kortikalen Schichten. Die schematischen Zeichnungen der Pyramidenzellen stehen nicht im Verhältnis zueinander. Abbildung

(A, B und C) sind adaptiert an der Abbildung 1b und 1c aus Spruston, N., *Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. Nat Rev Neurosci, 2008. 9(3): p. 206-21.*

1.3.3 Die dendritischen Dornfortsätze

1.3.3.1 Aufbau, Funktion und Plastizität

Die Dornfortsätze wurden erstmals von dem spanischen Histologen Santiago Ramón y Cajal im Jahre 1888 beschrieben [139]. Spätere elektronenmikroskopische Studien bestätigten seine Beobachtung, dass diese postsynaptischen Kompartimente den Großteil der exzitatorischen Signale im ZNS empfangen [131-133].

Vereinfacht kann der Aufbau eines Dornfortsatzes in einen kugeligen Kopf und einen dünnen Hals unterteilt werden, der mit dem Dendriten verbunden ist [140]. Während der Entwicklung und des Wachstums durchlaufen die Spines signifikante morphologische Veränderungen, die direkt mit der Veränderung ihrer synaptischen Funktion verknüpft sind [140]. Man unterscheidet verschiedene Entwicklungsstufen, die einen kontinuierlichen Übergang durchlaufen (Abb. 12A) [141]. Eines der verbreitetsten Schemata, die von Peters und Kaiserman-Abramoff im Jahr 1970 eingeführt wurden, teilt die Dornfortsätze in die folgenden drei Kategorien ein [142]: Zunächst werden die Dornfortsätze vom Thin-Typ unterschieden, die $< 2 \mu\text{m}$ lang sind und einen relativ kleinen Kopf besitzen. Darauf folgen die reiferen Stubby-Typen, die keinen Hals besitzen und mit einem Länge-Breiten-Verhältnis von < 1 charakterisiert sind [142]. Schließlich wachsen sie zu den Spines vom Mushroom-Typ aus [142]. Sie bilden einen etwa 1 femtoliter großen und $> 0.6 \mu\text{m}$ breiten Kopf aus, der durch einen dünnen Hals (ca. $0.5 \mu\text{m}$ Länge und $0.1 \mu\text{m}$ Breite) mit dem Dendriten verbunden ist [140, 142]. Skoff und Hamburger (1974) haben eine weitere Gruppe von Dornfortsätzen zur Nomenklatur hinzugefügt [143]: Die Dornfortsätze vom Filopodia-Typ, benannt nach ihrer Haar-ähnlichen Form. Diese $> 2 \mu\text{m}$ langen, sehr beweglichen Ausstülpungen scheinen die jüngste Entwicklungsstufe der dendritischen Dornfortsätze zu sein [141, 143].

Das Gerüst der Zelle besteht aus dem Zytoskelett und determiniert die Zellform und die Organisation des Zytoplasmas [144]. Das Zytoskelett der neuronalen Dendriten besteht aus Mikrotubuli, Neurofilamenten und Aktin-Filamenten [145]. In den Dornfortsätzen dominieren die Aktin-Filamente [145]. Es wird angenommen, dass die Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung wichtige Vorgänge für die

Ausbildung und Beweglichkeit der Dornfortsätze sind [145-149]. Weiterhin ist das Aktin-Netzwerk mit der Postsynaptic Density (PSD) assoziiert. Die PSD ist eine spezialisierte Struktur in der postsynaptischen Membran, bestehend aus hunderten von Proteinen, die Rezeptoren und Signalproteine organisiert und stabilisiert [150, 151]. Daher wird angenommen, dass das Zytoskelett der Dornfortsätze über die synaptische Plastizität einen direkten Einfluss auf die funktionelle Organisation ausübt [152]. Studien zu neurologischen Entwicklungsstörungen deuten darauf hin, dass die Mutationen jene Gene betreffen, die Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts der Dornfortsätze kodieren (siehe 1.4.2) [153, 154].

Die Dornfortsätze sind über den ganzen Dendritenbaum verteilt. Valverde (1967) zeigte eine exponentielle Zunahme der Spine-Dichte an den apikalen Dendriten mit Entfernung vom Soma [155]. Die Ergebnisse von Marin-Padilla (1968) deuten darauf hin, dass die Verteilung der Dornfortsätze auf einem Dendriten als eine Serie von Gauß-Kurven beschrieben werden kann [156]. Die Spine-Dichte variiert nicht nur innerhalb eines Dendriten, sondern auch zwischen den kortikalen Arealen [157, 158]. Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, dass die höher geordneten Hirnareale wahrscheinlich mehr Synapsen und damit mehr Dornfortsätze erfordert [140].

Dornfortsätze variieren stark in ihrer Größe und Form und sind sehr plastisch [130, 159]. Sie sind hoch dynamische Strukturen, die kontinuierlich geformt sowie auf- und abgebaut werden [160-163]. Strukturelle und funktionelle Veränderungen der dendritischen Spines sind entscheidend für die synaptische Plastizität, ein Modell für den Prozess des Lernens und Erinnerns [152]. Obwohl sich die technischen Grenzen die Untersuchung der Spines unter normalen Bedingungen herausfordernd gestalten, weisen Publikationen darauf hin, dass eine separate Gruppe mit stabilen und eine Gruppe mit mehr plastischen Spines in vivo existieren, und dass diese Gruppen sich mit dem Lernprozess verändern können [160, 161, 163, 164].

Unreife Formen von Dornfortsätzen, wie die Spines vom Filopodia-Typ, sind sehr beweglich und tragen vermutlich zur Initiierung von synaptischen Kontakten und zum Lernprozess bei [165-169]. Im Vergleich dazu sind die größeren, ausgereiften Dornfortsätze vom Mushroom-Typ stabiler und leisten wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zur Erinnerungsfähigkeit bei [168, 169]. Es wird vermutet, dass nicht alle Dornfortsätze den gleichen Differenzierungsweg durchlaufen, also

beginnend als Filopodia-Typen, über die Thin- und Stubby-Typen bis hin zur Mushroom-Form. Zeitrafferaufnahmen in vivo haben gezeigt, dass Spines vom nicht-Mushroom-Typ über Tage morphologisch unverändert bleiben können, während Spines vom Mushroom-Typen verschwinden oder sich in einen anderen Typen ändern können [140]. Störungen in der Ausreifung der Dornfortsätze können zu Änderungen im neuronalen Schaltkreis führen, wie in einigen neurologischen Syndromen beobachtet wurde (siehe 1.4.2) [170, 171]. Weiterhin haben Studien gezeigt, dass die Langzeitpotenzierung (engl. long-term potentiation, LTP) und Langzeitdepression (engl. long-term depression, LTD) mit einer Vergrößerung bzw. Schrumpfung der Spines assoziiert sind [172-176].

Die Dichte der Dornfortsätze passt sich der Umgebung an und ist u.a. von der Menge am afferenten Input abhängig. Parnavelas (1974) zeigte durch eine Verstärkung und Verminderung von afferentem Signal sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Anzahl an Spines [177]. Dieser Befund zeigt die bidirektionale Regulierung der Dichte und deutet darauf hin, dass die Dichteänderung ein Mechanismus der Adaptierung an afferenten Signalen ist und dass die Dornfortsätze durch regelmäßige, afferente Inputs aufrecht erhalten bleiben [140, 175]. Zusammengefasst lassen die Studien darauf schließen, dass die Umstrukturierung der Dornfortsätze der Formung und Verfeinerung der neuronalen Konnektivität dient [152].

1.3.3.2 Spinogenese

In einigen Spezies entstehen die Dornfortsätze der Pyramidenzellen nach der Geburt. In Ratten beginnt die Spinogenese in der ersten postnatalen Woche [178]. In den darauffolgenden vier Wochen nimmt die Dichte der Dornfortsätze kontinuierlich zu, bevor sie anschließend mit dem Alter wieder abnimmt [179].

Die Frage, wie und unter welchen Bedingungen dendritische Dornfortsätze entstehen, ist von großer Bedeutung, um die Entwicklung des neuronalen Schaltkreises und die Pathogenese neurologischer Entwicklungsstörungen zu verstehen [180]. Mittlerweile haben sich drei Modelle zur Spinogenese etabliert: Das Sotelo-, das Miller-Peters- und das Filopodia-Modell (Abb. 4) [180].

Das Sotelo-Modell bezieht sich auf die Spinogenese auf Purkinje-Zellen. Dem Modell zufolge erfolgt die Entstehung der Dornfortsätze intrinsisch und zellautonom [180, 181]. Die Neurone können nicht nur selbst Dornfortsätze bilden, sondern

haben wahrscheinlich auch einen autonomen Mechanismus, der die Dichte der Spines kontrolliert [182-185].

Das Miller-Peters-Modell teilt die Spinogenese in drei Stadien auf [186]. Dabei kommt es zu einem sequentiellen Wachstum der Spines aus den Dendriten, das vom präsynaptischen Ende getriggert wird [180]. Zunächst entstehen Stubby-förmige Dornfortsätze, deren präsynaptische Regionen durch Akkumulation synaptischer Vesikel anschwellen [186]. Schließlich formen sich mithilfe des präsynaptischen Triggers dünne oder Mushroom-förmige Dornfortsätze [186].

Das am häufigsten angewendete Modell, das Filopodia-Modell, postuliert, dass die zunächst gebildeten Dornfortsätze vom Filopodia-Typ synaptische Kontakte etablieren [180, 187]. Diese fangen die präsynaptischen Enden ein und führen sie in Richtung des Dendriten, wo sie die weitere Entwicklung der Spines induzieren [187, 188].

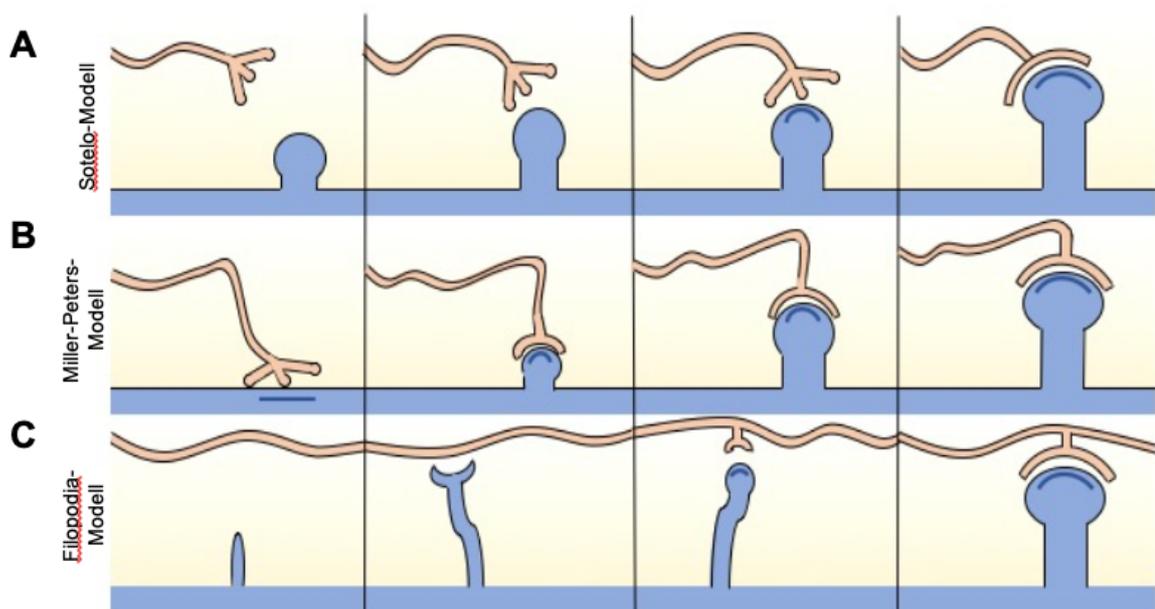


Abbildung 4: Die wesentlichen Schritte der drei Spinogenese-Modelle. (A) Im Sotelo-Modell erfolgt die Ausbildung der Dornfortsätze intrinsisch. **(B)** Das Miller-Peters-Modell besagt, dass das sequentielle Wachstum der Spines durch die präsynaptischen Enden getriggert wird. **(C)** Im Filopodia-Modell erfolgt die Ausbildung der Dornfortsätze durch Etablierung synaptischer Kontakte durch Filopodia-förmige Spines. Abbildung (A, B und C) sind adaptiert an der Abbildung 3 aus Yuste, R. and T. Bonhoeffer, *Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. Nat Rev Neurosci*, 2004. 5(1): p. 24-34.

1.4 Neuronale Morphologie und mentale Retardierung

1.4.1 Zusammenhang von *CBP*-Mutationen und mentaler Retardierung

Das Gedächtnis, Kennzeichen der kognitiven Fähigkeiten des Menschen, kann bezüglich der Dauer der Speicherung von Informationen in ein Kurzzeitgedächtnis (short-term memory, STM) und ein Langzeitgedächtnis (long-term memory, LTM) unterteilt werden [189]. Das STM dauert Minuten bis Stunden an und wird wahrscheinlich durch temporär anhaltende Modifikationen bereits existierender, synaptischer Rezeptoren und Enzyme vermittelt [190]. Im Gegensatz dazu besteht das LTM Tage oder länger fort und benötigt vermutlich die Ausbildung neuer Synapsen und die Umstrukturierung der bereits vorhandenen Synapsen [190, 191]. Derzeit wird angenommen, dass das LTM die Transkription und Translation neuer Proteine benötigt [192, 193]. Dies wirft die Frage auf, welche Transkriptionsfaktoren für die Genexpression im LTM benötigt werden [190].

Anhand mehrerer Tierversuche steht CBP unter Verdacht eine bedeutende Rolle in der Ausbildung des LTM zu spielen. Alarcon et al. (2004) haben bei der Untersuchung von heterozygoten *CBP*-Knockout-Mäusen festgestellt, dass die Mäuse im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Leistung des LTM erbringen, während das STM nicht signifikant verändert war [63]. Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass eine reduzierte KAT-Aktivität von CBP zu Defiziten in der hippocampalen synaptischen Plastizität und im Erinnerungsvermögen führt [194-196]. Zusätzlich scheint die adulte Neurogenese wichtig für das Erinnerungsvermögen zu sein, eine Fähigkeit, die bei heterozygoten *CBP*-Knockout-Mäusen gestört ist [63, 197, 198]. Schließlich haben Ergebnisse aus Publikationen gezeigt, dass die exprimierten Gene beim Vorgang des Lernens und des Erinnerns teilweise unter Kontrolle von Kinase-Stoffwechselwegen stehen, die durch CREB vermittelt werden [8]. Zu diesen Genen gehören u.a. *protein kinase A (PKA)*, *mitogen-activated protein kinase (MAPK)* und *Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV)* [8, 199-201]. Das bedeutet, dass CBP direkt an diesen Stoffwechselwegen und so am Lernprozess beteiligt ist [8].

1.4.2 Zusammenhang von Morphologie und mentaler Retardierung

Mit der Annahme, dass dendritische Dornfortsätze eine essentielle Rolle in der Neurotransmission, Plastizität sowie im Lern- und Erinnerungsvermögen spielen,

kann daraus geschlossen werden, dass eine Reihe neurologischer Entwicklungsstörungen mit ID u.a. mit Alterationen in der Morphologie und in der Dichte der Pyramidenzellen und Dornfortsätze assoziiert sind [140].

Eine frühe Exposition mit Alkohol, deren Symptome als fetales Alkoholsyndrom zusammengefasst werden, ist eine bekannte Ursache für ID [202]. An Rattenmodellen zeigte sich, dass Alkohol u.a. die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen und die Migration von kortikalen Neuronen beeinflusst und eine massive Apoptose in mehreren Hirnstrukturen, u.a. im zerebralen Kortex, hervorruft [202-205]. Auch in anderen neurologischen Entwicklungsstörungen, wie im Fragilen X-Syndrom und Rett-Syndrom, zeigen sich Störungen in der Ausreifung von Neuronen [206, 207]. Mithilfe der Golgi-Färbung konnte ein Zusammenhang zwischen mentaler Retardierung und Änderungen der dendritischen Dornfortsätze beobachtet werden [208, 209]. Diese Studien zeigen grundsätzlich zwei Dismorphien: ein gestörtes Wachstum der apikalen und basalen pyramidalen Dendriten sowie eine Fehlentwicklung der Dornfortsätze von kortikalen Pyramidenzellen. Bisher wurden vor allem an Trisomie 21 und am Fragilen X-Syndrom die veränderte neuronale Morphologie untersucht. Bei Patienten mit Trisomie 21, die als häufigste Ursache für eine ID gilt, fanden sich eine Abnahme der Spine-Dichte im Neokortex und eine Zunahme abnormal langer Spines [156, 210-212]. Auch Studien an Gehirnen von Patienten mit dem Fragilen X-Syndrom, die zweithäufigste Ursache für eine ID, ergab eine erhöhte Anzahl unreifer, langer Spines in kortikalen Pyramidenzellen [212-214].

1.4.3 Morphologie beim Rubinstein-Taybi-Syndrom

Aufgrund vorheriger Studien an ID-verursachenden Syndromen ist eine zerebrale Architekturstörung als Ursache der mentalen Retardierung bei RSTS-Patienten anzunehmen. Bisher sind die Gehirne von RSTS-Patienten nur wenig verstanden worden. Alari et al. (2018) konnten erstmalig morphologische Alterationen und eine Untererregbarkeit bei *CBP*- und *p300*-defizienten Neuronen nachweisen [69]. Anhand von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC)-basierten Neuronen von RSTS-Patienten mit *CBP*- oder *p300*-Mutationen zeigte die Arbeitsgruppe eine veränderte Morphologie, die sich mit einer signifikant verkürzten Länge der Dendriten und einer vermehrten Verzweigung dieser auszeichnete [69]. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den wenigen neuropathologischen Untersuchungen

von Autopsien von RSTS-Patienten, bei denen verkleinerte Neurone beschrieben wurden [215-217]. Diese beobachteten Anomalien der Neurone könnten eines der zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen für die ID von RSTS-Patienten sein. Die Zunahme der dendritischen Verzweigungen stimmen nicht mit der berichteten Abnahme von Spines auf iPSC-Neuronen anderer neurologischer Entwicklungsstörungen überein [69, 218-220]. Laut Alari et al. (2018) ist diese Unstimmigkeit wahrscheinlich der verfrühten Analyse der Neurone geschuldet, die im Laufe ihrer Differenzierung möglicherweise ein Teil ihrer Dornfortsätze wieder verlieren würden [69].

2. Hypothese und Zielsetzung

Das Rubinstein-Taybi-Syndrom ist eine archetypische, neurologische Entwicklungsstörung, die mit einer mentalen Retardierung, einer postnatalen Wachstumsverzögerung und fazialen Anomalien charakterisiert ist [1]. Die Ursache lässt sich auf Mutationen der CBP- und p300-kodierenden Gene zurückführen [6]. Obwohl Studien mit Mausmodellen für das RSTS auf eine Korrelation des CBP mit der Kognition und Gedächtnisbildung hinweisen, konnte bisher nur unzureichend eine Beziehung zwischen der Morphologie der Neurone und der geistigen Behinderung und Lernschwäche beschrieben werden [63, 194-196]. Da eine strukturelle Alteration eng mit einer funktionellen Veränderung verknüpft ist, wie einige Studien an anderen neurologischen Symptomen hinweisen, wird in dieser Arbeit eine morphologische Anomalie der Neurone beim RSTS angenommen [137, 156, 179, 208, 210-214, 221]. Um ein umfassenderes Verständnis der Pathogenese von RSTS zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des CBP in der morphologischen Entwicklung der Neurone untersucht. Dabei wurde die veränderte Struktur der Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V mithilfe des *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodells beobachtet und analysiert. Die dendritischen Dornfortsätze wurden hinsichtlich ihrer Dichte und ihrer strukturellen Alterationen untersucht. Weiterhin ließen sich durch eine Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur Schlussfolgerungen zu der Auswirkung des CBP-Defizits auf Neurone *in vivo* ziehen.

3. Material und Methoden

3.1 Tierversuche

Für diese Arbeit wurden *hGFAPcre::CBP^{F1/F1}* transgene Mäuse verwendet. Normale C57BL/6J-Mäuse dienten als Wildtypkontrollen. Alle Tierversuche entsprachen den Anforderungen der Verordnung zum Schutz von zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013) zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU vom 22. September 2010, Anlage 1, Abschnitt 2 und 3. Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. Sie wurden in geschlechtergetrennten Gruppen von bis zu fünf Mäusen untergebracht. Ventilierte Käfige mit einer steriler Umgebung und einer konstanten Temperatur von $23 \pm 2^\circ\text{C}$ wurde sichergestellt. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von zwölf Stunden wurde sichergestellt. Die Tiere hatten stets Zugang zur benötigten Nahrung. Vor Präparation der Gehirne wurden adulte Tiere nach anästhetischer Versorgung manuell zervikal disloziert und < 14 Tage alte Mäuse wurden dekapitiert.

3.1.1 *hGFAPcre::CBP^{F1/F1}* transgenes Maus-Modell

Mit dem Ziel ein Mausmodell für das Rubinstein-Taybi-Syndrom zu generieren, wurde ein LoxP-cre Mausmodell mit einer CBP-Defizienz in hGFAP-positiven (human glial fibrillary acidic protein promoter) Zellen erstellt.

Das Cre-LoxP-Rekombinationssystem bietet eine Vielfalt an Möglichkeiten für die Erzeugung von Knockout-Mäusen an und findet in der Mausgenetik breite Anwendung. Anders als bei einem totalen Gen-Knockout ermöglicht das Cre-LoxP-System eine konditionale, d.h. eine zeit- und gewebespezifische Deletion von bestimmten Genen. Das Cre-Enzym (cyclization recombination) gehört zur Enzymklasse der Rekombinasen und katalysiert die Spaltung oder Neuorientierung von einer spezifischen Gensequenz, die von der Erkennungssequenz LoxP (locus of X1-over P1) flankiert bzw. „gefloxt“ (flanked by LoxP) wird. Sind die LoxP-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert, wird die gefloxt Gensequenz mit einer LoxP-Sequenz exzidiert und die verbleibende, ringförmige DNA-Struktur in der Zelle wird abgebaut (Abb. 5). Stehen die LoxP-Sequenzen in entgegengesetzter Richtung, so wird das dazwischenliegende Exon invertiert.

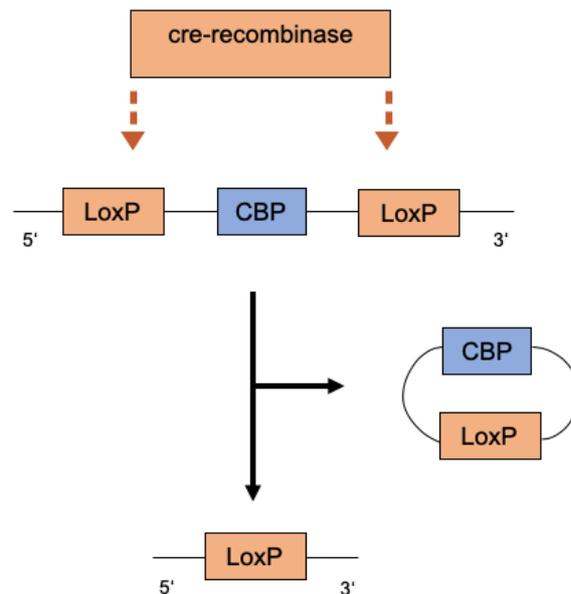


Abbildung 5: Das *hGFAP-cre::CBP^{F/FI}*-Mausmodell. Das gefloخته *CBP* wird unter Kontrolle des *hGFAP*-Promoters durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten.

Globale Knockouts von Genen, die in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden, resultierten oft in einem letalen Phänotyp, der eine Analyse des zentralen Nervensystems nicht mehr erlaubte. Um eine spezifisch im zentralen Nervensystem befindliche *CBP*-Defizienz in einem Mausmodell zu generieren, orientierten wir uns an der Publikation von Zhuo et al., die eine transgene Linie mit einer unter Kontrolle des human glial fibrillary acidic protein (*hGFAP*)-Promotors exprimierten Cre-Rekombinase erstellten [222]. Der *hGFAP*-Promotor kontrolliert die Expression von Genen spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen.

3.1.2 Genotypisierung der Mäuse

Für die Genotypisierung wurden Biopsien der Schwanzspitze von ein Tag alten (P1) bzw. Ohrstanzbiopsien von P21 oder älteren Mäusen entnommen. Zunächst wurde die Gewebeprobe in einem Thermomixer (Eppendorf, ThermoMixer C) für zwei Stunden bei 56 °C lysiert, nachdem 500 µl eines Lysepuffers (5 M NaCl, 20 % SDS, 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 20 µl/ml Proteinkinase K in ddH₂O) hinzugegeben wurden. Danach wurde die Probe für fünf Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Thermo Scientific, Heraeus Pico 17 Centrifuge) und der Überstand mit 500 µl Isopropanol gemischt, das eine Ausfällung der DNA verursachte. Nach einer weiteren Zentrifugation für fünf Minuten bei 14.000 rpm wurde das Sediment im TE-

Puffer (20 mM TRIS, 1 M EDTA in ddH₂O) gelöst und für eine Stunde bei 37 °C in den Thermomixer gestellt. Diese Lösung mit der darin befindlichen DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt und konnte nun als Rohmaterial für weitere Arbeitsschritte der Genotypisierung benutzt werden. Die Genotyp-spezifische Region des Genoms wurde mithilfe von in der PCR genutzten Primer amplifiziert (Tab. 1). Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte über eine Gel-Elektrophorese. Dazu wurden 50 ml eines 2 %igen Agarosegels mit 5 µl Ethidiumbromid hergestellt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend für 30 Minuten bei 130 V aufgetrennt.

Primer	5`-3`-Sequenz
Cre fwd.	TCCGGGCTGCCACGACCAA
Cre rev.	GGCGCGGCAACACCATTTT
CBP fwd.	CCTCTGAAGGAGAAACAAGCA
CBP rev.	ACCATCATTTCATCAGTGGACT

PCR-Schritt	Temperatur [C°]	Zeit [s]
Denaturierung	95	120
Denaturierung	95	30
Primerhybridisierung	60	30
Elongation	72	60
Elongation	72	120
Stop	4	-

Tabelle 1: verwendete Primer-Sequenzen und PCR-Zyklen für die Genotypisierung.

3.1.3 Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur

Das Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur-System wurde erstmals von Banker und Goslin 1998 beschrieben [223-225]. Die Kultur von postnatalen Neuronen von Mäusen ist erfahrungsgemäß anspruchsvoller als die von embryonalen Neuronen [226]. Mit dem Banker-Modell ist die Polarisierung der Neurone mit Entwicklung von apikalen und basalen Dendriten sowie die Ausbildung von funktionierenden Spines und synaptischen Kontakten möglich [224]. Dabei wird die gesunde Kultur der Neurone durch die trophischen Bedingungen der benachbarten und physisch

getrennten astrozytären Feeder-Zellen ermöglicht. Für diese Arbeit wurde eine modifizierte Version des Banker-Protokolls verwendet, bei der die Neurone über 21 Tage *in vitro* (days *in vitro*, DIV) kultiviert werden konnten (Abb. 6). In dieser Zeit sind die Dendriten und Dornfortsätze ausgereift und können untersucht werden [227].

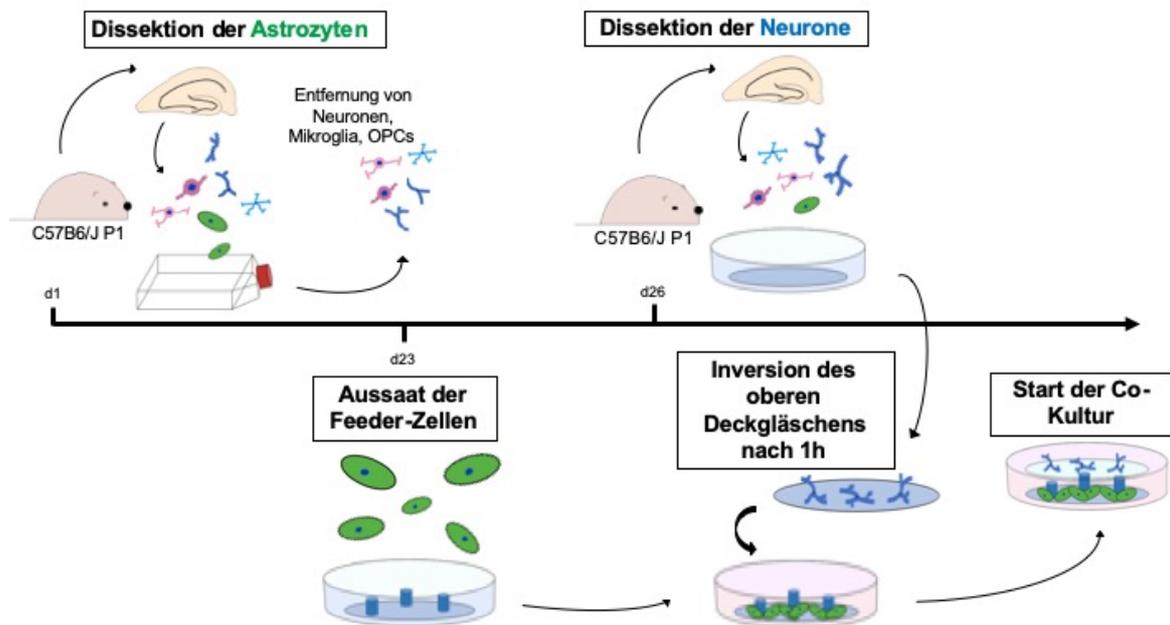


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Astrozyten-Neuronen-Sandwich-Co-Kultur. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Version des Banker-Protokolls. Zu sehen sind die Schritte bis zur Aussaat der Co-Kultur, abgebildet über eine Zeitachse. Folgende Zellen sind aufgeführt: Astrozyten (grün), Neurone (blau), Mikrogliazellen (hellblau), OPCs (oligodendrocyte progenitor cells, rosa und rotviolett). Die Abbildung ist adaptiert an der Abbildung 1 aus dem Protokoll „*Neuron-Astrocyte sandwich co-culture assay Banker style*“ (19.05.2017) des Instituts der Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Die für die Zellkultur benötigten Medien und Lösungen wurden stets frisch angesetzt (Tab. 2 und 3). Ein Monat vor der Auslegung der Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur wurde für die Aussaat und Expansion von Astrozyten das Gehirn einer CBP-defizienten P1-C57BL/6J-Maus bzw. einer Kontrollmaus entnommen. Das Gewebe wurde in eine mit DM gefüllte Petrischale transferiert, um es vor Austrocknung zu schützen. Unter dem binokularen Mikroskop mit Farbkamera (Leica M165 FC und Leica DFC7000 T) wurden die Meningen und der Plexus Choroideus mithilfe von Pinzetten sorgfältig entfernt, um eine Kontamination mit

meningealen Fibroblasten und Endothelzellen vorzubeugen. Die beiden Kortizes wurden präpariert und in ein gekühltes, mit DM gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt.

Das Zentrifugenröhrchen wurde nach jedem Arbeitsschritt stets auf Eis inkubiert. Unter der Sterilbank (Heraeus, Heracell 240) wurde das präparierte Gewebe mit DM gewaschen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, das danach mit 4,5 ml DM gefüllt wurde. Es wurde 1 ml Trypsin 0,05 % (alternativ 0,5 ml Trypsin 2,5 %) in die Suspension hinzugegeben und bei 37°C im Wasserbad für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der 1mg/ml DNase I in das Röhrchen pipettiert und nach einer Minute 5 ml NMM hinzugegeben, um den enzymatischen Verdau abubrechen. Das gesamte Volumen von 10 ml wurde für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Thermo Electron Corporation, Multifuge 3 S-R). Der Überstand wurde dekantiert und 2 ml NMM wurden hinzugegeben bevor die Gewebestücke mithilfe einer Pipette mehrmals resuspendiert wurden. Nach Gabe von weiteren 2 ml NMM wurde die Suspension erneut für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit GGM gewaschen und durch ein 70 µm-Zellsieb gegeben. In der Regel ergeben zwei Hälften von Kortizes etwa 1.200.000 Astrozyten/ml. Die Zellsuspension wurde in eine T75 cm²-Zellkulturflasche pipettiert und der Inhalt mit 10 ml GGM aufgefüllt. Die Astrozytenkultur wurde engmaschig überwacht und gesplittet, sobald die Zellen konfluent waren. Das Medium wurde alle fünf bis sieben Tage gewechselt. Dabei ist es wichtig Neuronen, Mikroglia- und Oligodendrogliazellen zu entfernen, um eine reine Astrozytenkultur für die spätere Verwendung als Feeder-Zellen sicherzustellen.

Zur Vorbereitung des Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur-Systems wurden Deckgläschen mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen und bei 200 °C sterilisiert. Für die Astrozytenkultur wurden Deckgläschen mithilfe einer 10 µl-Pipette mit dreieckig angeordneten Paraffinpunkten präpariert. Das Paraffin wurde vorher bei einer Temperatur von 95 °C geschmolzen. Die Deckgläschen wurden in einer 24-Well-Platte unter UV-Licht sterilisiert. Für die Neuronen wurden die Deckgläschen ein bis zwei Tage vor der Aussaat der Sandwich-Co-Kultur mit Poly-L-Ornithin 1x behandelt und unter sterilen Bedingungen bei 4 °C gelagert.

Vier Tage vor Aussaat der Neuronenkultur wurden die Astrozyten auf den Deckgläschen ausplattiert nachdem mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt wurde. Pro präpariertes Deckgläschen wurden 80.000 Astrozyten

ausgelegt und mit 2 ml GGM bedeckt. Nach zwei Tagen wurde das Medium mit 2 ml NMM ausgetauscht. Die Präparation der Neurone erfolgte, bis auf die Verwendung von NMM statt GGM, nach den gleichen Schritten wie die der Astrozyten. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden jeweils 50.000 Neurone auf ein vorbereitetes Glasplättchen ausgelegt. Nach einer Stunde wurden die mit Neuronen versehenen Deckgläschen umgedreht und vorsichtig auf den Paraffinpunkten über der Astrozytenkultur gelegt. Alle vier bis fünf Tage wurde die Hälfte des Mediums (entspricht 1000 µl) entnommen und 1000 µl frisches NMM hinzugegeben. Beim ersten Mediumwechsel wurden zusätzlich 10 µM FUDR hinzugegeben, um die Mitose zu inhibieren.

Um die Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur zu beenden, wurden die Deckgläschen mit den adhärenen Neuronen aus der Sandwich-Co-Kultur entnommen und in eine 24-Well-Platte mit vorgewärmten DPBS überführt. Es folgte die Fixation und Fluoreszenzfärbung der Neurone (siehe 3.2.1).

Medien und Lösungen	Komponenten
Dissection medium (DM)	HBSS 1x + 1 % P/S + 10 mM HEPES + 0,6 % einer 45 % Glukose-Lösung, bei 4 °C Lagerung bis zu einem Monat möglich
Glial growth medium (GGM)	DMEM + 0,6 % einer 45 % Glukose-Lösung + 1 % P/S + 10 % FBS, bei 4 °C Lagerung bis zu einem Monat möglich
Neuronal maintenance medium (NMM)	Neurobasal-Medium + 2 mM Glutamax + 2 % B27-Supplement + 1 % P/S + 25 µM β-ME, bei 4 °C Lagerung für 10 – 12 Tage möglich
Poly-L-Ornithin (PLO)-Lösung	PLO 1x in ddH ₂ O
β-Mercaptoethanol (β-ME)-Lösung	25 mM β-ME-Lösung in DPBS 1x

Tabelle 2: Medien und Lösungen für die Präparation der Zellen.

Zellkulturzusätze und Stammlösungen	Hersteller
B27-Supplement Serumfreies Supplement 2%	Thermo Fisher Scientific
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco by Life Technologies

DNase I	Roche
DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Gibco by Life Technologies
FBS Fetal bovine serum	Gibco by Life Technologies
FUDR 5-fluorodeoxyuridine (Floxyuridin)	Sigma Aldrich
L-Glutamine	Gibco by Life Technologies
HBSS Hank's Balanced Salt Solution	Invitrogen Life Technologies
Hepes	Gibco by Life Technologies
Neurobasal-Medium	Gibco by Life Technologies
PLO Poly-L-Ornithine	Sigma Aldrich
P/S Penicillin-Streptomycin	Gibco by Life Technologies
Trypsin	Gibco by Life Technologies

Tabelle 3: Zellkulturzusätze und Stammlösungen zum Ansatz der Co-Kultur.

3.2 Färbemethoden

3.2.1 Immunhistochemie

Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die oberen Deckgläschen mit den Neuronen in eine neue Zellkulturplatte überführt und zweimal für je 5 Minuten mit 1 ml DPBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Deckgläschen 30 minutenlang in Paraformaldehyd (4-prozentige Lösung in DPBS, pH 7,4) gehalten und anschließend erneut mit DPBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit DPBS + 0,3 % Triton X-100 (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether, DPBS-T) gewaschen. Darauffolgend wurden die Zellen für eine Stunde in der Blocking-Lösung (Normal Goat Serum, Millipore, 1:9 in DPBS-T) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper anti-MAP2- (Sigma-Aldrich, 1:500 in Blocking-Lösung) und anti-CBP-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies, 1:50 in Blocking-Lösung) über Nacht bei 4 °C auf die Zellen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die überschüssigen Antikörper mit DPBS ausgespült, bevor die Neurone mit dem Sekundärantikörper (Alexa 488 und Alexa 546, Invitrogen Life Technologies, 1:500 in DPBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol,

Carl Roth, 1:000 in DPBS) wurde für die Visualisierung der Zellkerne verwendet. Schließlich wurden die Deckgläschen mit wasserlöslichen Einschlussmittel Mowiol (Carl Roth) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Proben wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop-Modell von Nikon (Eclipse Ti2) untersucht.

3.2.2 Golgi-Cox-Färbung

Die Golgi-Färbung, entwickelt vom italienischen Histologen Camillo Golgi, ist eine neurohistologische Färbemethode zur Darstellung einzelner Neuronen [228]. Die Imprägnation beruht auf einer Ausfällung von Silberchromat auf den Membranoberflächen der Zellen [229]. Für die Golgi-Färbung wurde das FD Rapid GolgiStain™ Kit (FD NeuroTechnologies, Catalog #PK401) verwendet, welches eine von Cox modifizierte Version der klassischen Golgi-Färbemethode ist und die benötigten Lösungen A – E für die Durchführung beinhaltet. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Ein Tag vor der Präparation der Gewebeprobe wurde die Lösung A + B (1:1-Verhältnis) angesetzt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Nach Entnahme des Gehirns aus einer p30-Maus, wurde das Gewebe kurz mit ddH₂O abgespült und anschließend in ein lichtundurchlässiges Gefäß mit 6 ml der Lösung A + B (1:1-Gemisch) überführt. Die Probe wurde über Nacht bei Raumtemperatur in der Lösung A+B gelagert. Danach wurde die Probe in eine neue Lösung A + B überführt und für eine weitere Woche bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde die Probe in ein neues Gefäß mit 6 ml der Lösung C transferiert und für 24 Stunden bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Anschließend wurde die Lösung C aufgefrischt und die Probe wurde für weitere 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Eine längere Lagerung in der Lösung war jedoch auch möglich. Nach der Inkubation in der Lösung C wurde die Probe mit der frontalen Seite nach unten in eine 6-Well-Platte gelegt. Danach wurde eine 4-prozentige Agarose-Lösung angesetzt und in die Well-Platte gegeben.

Die erhärtete Agarosemasse wurde aus der Platte entnommen und überschüssiges Material wurde vorsichtig weggeschnitten. Mithilfe des Vibratoms (Leica VT1200 S) wurden 200 µm dicke Schnitte angesetzt. Dabei wurde eine Geschwindigkeit von 0.4 mm/s und eine Amplitude von 1 mm eingestellt.

Die Schnitte wurden zweimal mit ddH₂O für jeweils 2 Minuten gewaschen. Währenddessen wurde die Lösung D + E + ddH₂O (1:1:2-Verhältnis) für die

Farbentwicklung vorbereitet. 2 ml dieser Lösung wurden auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 8 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut zweimal mit ddH₂O für 4 Minuten gewaschen. Nach der Farbentwicklung wurden die Schnitte mit einem Pinsel auf ein Objektträger transferiert und getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläschen mit jeweils 200 µl Mowiol aufgebracht. Die Schnitte wurden für mindestens 24 Stunden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt bevor eine Untersuchung unter dem Mikroskop (Nikon, Eclipse Ti2) möglich war. Die Schnitte wurden stets lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

3.3 Statistische Analyse

Alle gewonnenen Daten wurden mithilfe der Prism6-Software (GraphPad) analysiert. Unterschiede zwischen den Mittelwerten von zwei Gruppen wurden mit dem unverbundenen t-Test auf Signifikanz geprüft. Der p-Wert für statistische Signifikanz lag dabei bei < 0.5 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001). Um die CBP-defizienten Mäuse und die Wildtypkontrollen zu vergleichen, wurden von jeder Gruppe mindestens drei Mäuse untersucht und von jeder Maus mindestens zehn Neurone analysiert. Die Histogramme stellen die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen dar.

4. Ergebnisse

4.1. Versuchstiere mit CBP-Defizienz zeigten strukturelle Veränderungen im Gehirn

Für eine allgemeine Übersicht der Hirnstrukturen wurden koronare Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Hirnschnitte von 30 Tage alten Kontroll- und *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mäusen angefertigt und miteinander verglichen (Abb. 7). Es war auffällig, dass in den CBP-defizienten Gehirnen die Hippocampi dysmorph und verkleinert waren. Weiterhin waren die lateralen Ventrikel deutlich dilatiert. Insgesamt waren die Gehirne verkleinert.

Um den Einfluss von CBP auf die Entwicklung und das Wachstum der Neurone näher zu untersuchen, entschieden wir uns eine Golgi-Cox-Färbung durchzuführen, so dass die mikrostrukturelle Neuroanatomie der Pyramidenzellen mit den basalen und apikalen Dendriten sowie den Spines dargestellt werden konnte. Hierbei handelt es sich um eine von Cox modifizierte Methode der Golgi-Färbung, bei der eine Silberimprägnation der Zellmembranoberflächen stattfindet [229]. In dieser Arbeit wurden die Pyramidenzellen der neokortikalen Lamina V in den Fokus gestellt. In vergangenen Studien wurden die Pyramidenzellen hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion am ausführlichsten in L5, der größten Output-Schicht des Neokortex, untersucht [130]. Ein Grund dafür ist wohl deren Zellkerngröße und die relativ geringe Dichte in L5, die eine Analyse der Zellen und ihrer mikroskopischen Einheiten ermöglichte.

Um ein besseres Verständnis für den Einfluss einer CBP-Defizienz auf die Entwicklung und Differenzierung der Neurone zu erhalten, wurde neben den Golgi-Cox-gefärbten Gewebeschnitten eine Zellkultur mit *CBP*-mutierten Neuronen angelegt. Dafür wurde ein modifiziertes Protokoll für die Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur nach Banker et al. veranlasst, das eine Polarisierung der Neurone mit Entwicklung von apikalen und basalen Dendriten ermöglichte [223, 224].

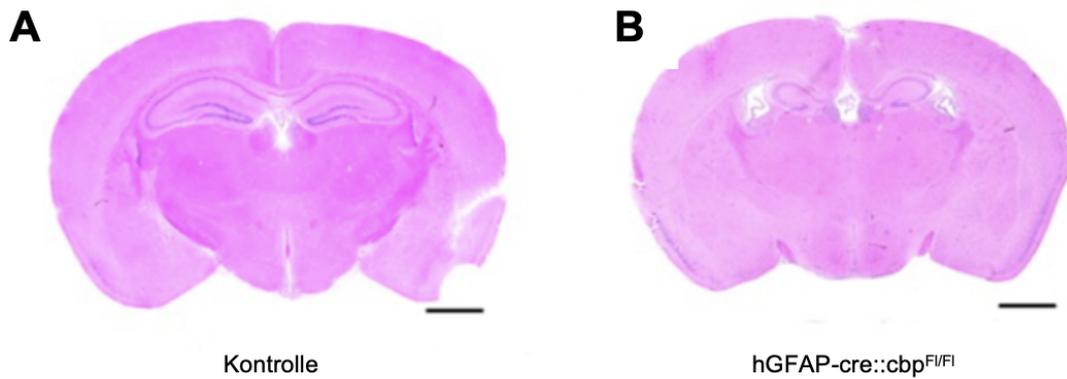


Abbildung 7: Koronare Hirnschnitte in HE-Färbung von p30-Mäusen. (A) WT-Maus. (B) Maus mit CBP-Defizienz. Sowohl der Hippocampus als auch die Ventrikel sind bei CBP-defizienten Mäusen verkleinert im Vergleich zur Kontrolle. Maßstabbalken: 1000 µm.

4.2 Morphologie der pyramidalen Dendriten

4.2.1 Die apikalen Dendriten der CBP-mutierten Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V sind signifikant verkürzt

Studien zeigten eine Reduktion in der Länge von pyramidalen Dendriten bei verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen [230, 231]. Um den Einfluss eines frühen CBP-Verlustes auf die Entwicklung und das Wachstum der Neurone zu untersuchen, wurden die Längen der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen ausgemessen. Für jede Versuchsgruppe wurden jeweils drei P30-Mäuse untersucht. Dabei wurden bei jedem Golgi-Cox-gefärbten, koronaren Gewebeschnitt auf Höhe des Hippocampus je 30 Neurone von der rechten und der linken Hemisphäre in der Region der Falx cerebri ausgemessen. Die Länge der apikalen Dendriten wurde vom Ansatz am Soma bis in die distale Spitze des Dendriten bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die apikalen Dendriten der CBP-defizienten Pyramidenzellen im Durchschnitt eine um die Hälfte reduzierte Länge besitzen (Abb. 8). Dies lässt vermuten, dass die mikrostrukturellen Alterationen funktionelle Konsequenzen mit sich tragen.

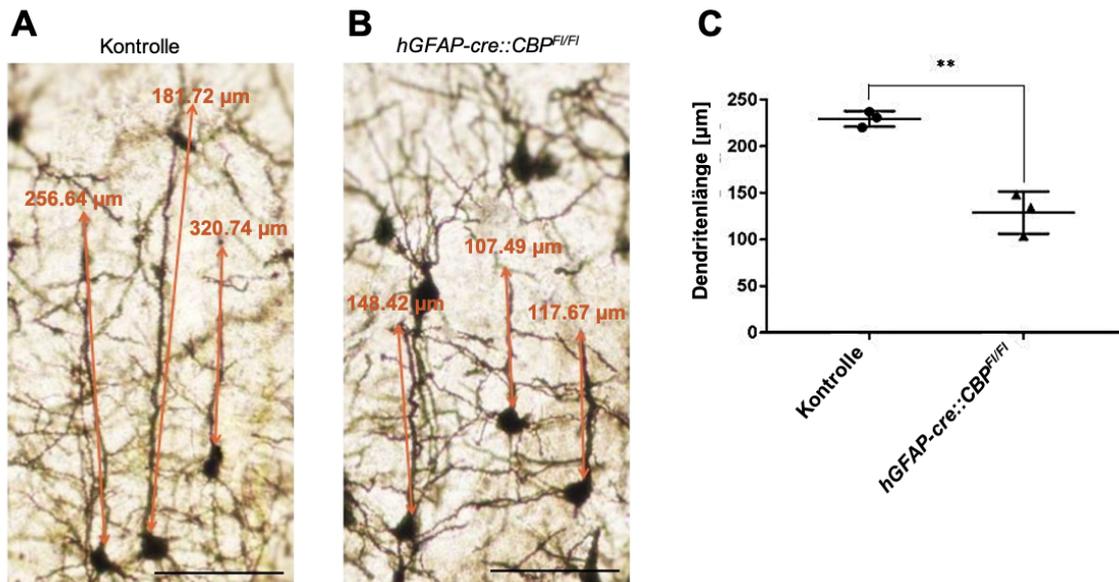


Abbildung 8: Die Länge der Dendriten ist signifikant kürzer bei CBP-defizienten Neuronen im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von Golgi-Cox-gefärbten Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V bei *CBP*-Mutation und Wildtypkontrolle. Maßstabbalken: 100 µm. **(C)** Quantifizierung der apikalen Dendritenlänge von pyramidalen Neuronen in der kortikalen Lamina V zeigt eine signifikante Verkürzung der Dendriten von CBP-defizienten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle. Messungen erfolgten an Pyramidenzellen von P30-Mäusen. ** $p < 0.01$.

4.2.2 Die Anzahl der sekundären Dendriten ist bei CBP-defizienten Pyramidenzellen unverändert

Vergangene Studien berichteten von einer reduzierten Anzahl an dendritischen Verzweigungen bei neurologischen Entwicklungsstörungen [230, 232]. Analog zu diesen Publikationen haben wir die Anzahl der sekundären Äste am apikalen Dendriten untersucht. Es wurden drei P30-Mäuse für jede Versuchsgruppe miteinbezogen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die sekundären Dendriten von zehn Neuronen pro Hemisphäre ausgezählt. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien ergab die Untersuchung keine signifikante Veränderung in der Anzahl an sekundären Verzweigungen pro Längeneinheit am CBP-defizienten Dendriten von Pyramidenzellen im Neokortex (Abb. 9). Das Ergebnis zeigt, dass bei einer signifikant verkürzten Länge der Dendriten die grundsätzliche Architektur der Neurone trotzdem erhalten bleibt. Es fanden sich weder eine Reduzierung der sekundären Neurone noch eine Kompensation dieser durch Expression vermehrter Verzweigungen.

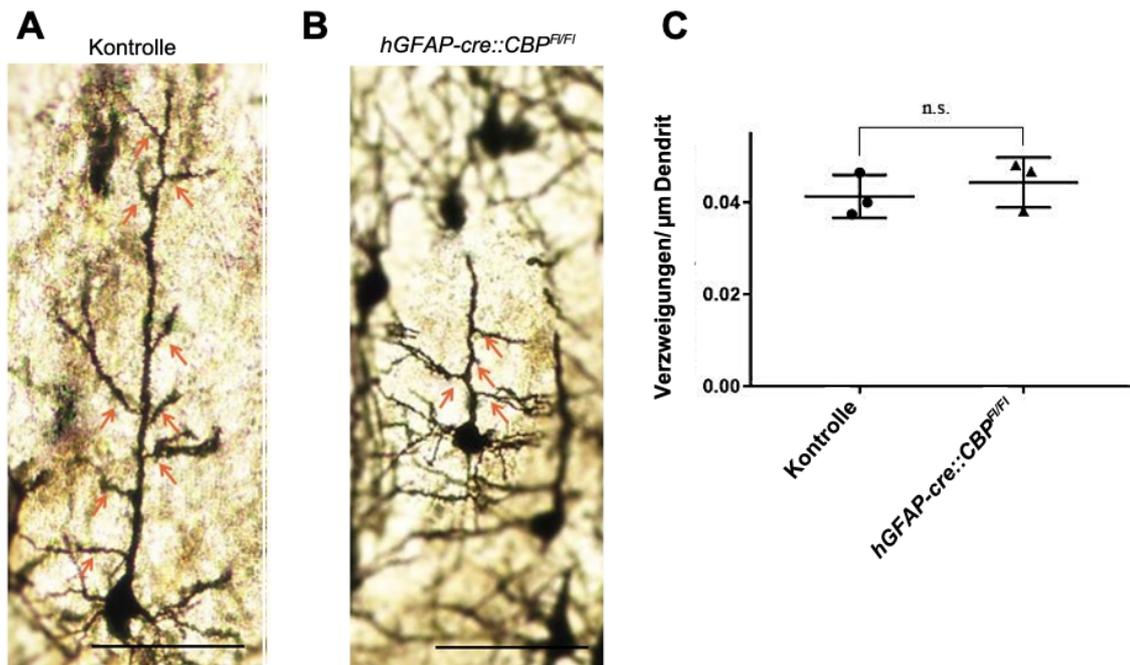


Abbildung 9: Die Anzahl an dendritischen Verzweigungen von CBP-defizienten Pyramidenzellen der kortikalen Lamina V zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von Golgi-Cox-gefärbten pyramidalen Neuronen im Kortex von einer Kontrolle und einer CBP-defizienten Maus. Maßstabbalken: 100 µm. (C) Die Quantifizierung erfolgte durch Berechnung der Anzahl der Verzweigungen pro µm des apikalen Dendriten bei drei Kontrollen und drei CBP-defizienten Mäusen. Die Messungen fanden an P30-Mäusen statt. $p = 0.505$.

4.2.3 Die Richtung und Orientierung der apikalen Dendriten ist bei CBP-Defizienz unverändert

Störungen in der neuronalen Zellmigration sowie in der Richtung und Orientierung der Neurone verursachen eine gestörte kortikale Funktion [233-235]. Aufgrund der in der Übersichtsaufnahme der Golgi-Cox-gefärbten Hirnschnitte auffällig ausgerichteten Neurone und der strukturellen Veränderungen in den HE-gefärbten Gewebeschnitten wurde zunächst die Richtung und Orientierung der Neurone zur kortikalen Oberfläche untersucht. Dabei wurde der abweichende Winkel zur Orthogonalen des Kortex ausgemessen. Für die Gruppe der *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mäuse und der Kontrollmäuse wurden jeweils drei P30-Versuchstiere untersucht. Mithilfe von koronaren, Golgi-Cox-gefärbten Hirnschnitten wurden die Winkelabweichungen zur Orthogonalen von zehn Neuronen pro Hemisphäre in der temporalen Region gemessen. Die Messungen ergaben keine signifikanten

Abweichungen der CBP-defizienten Neurone zur kortikalen Oberfläche (Abb. 10). Jedoch zeigte sich eine Tendenz dieser Neurone zu einer abnormen Abweichung ihrer Orientierung, wie sie im Graphen zu sehen ist (Abb. 10C).

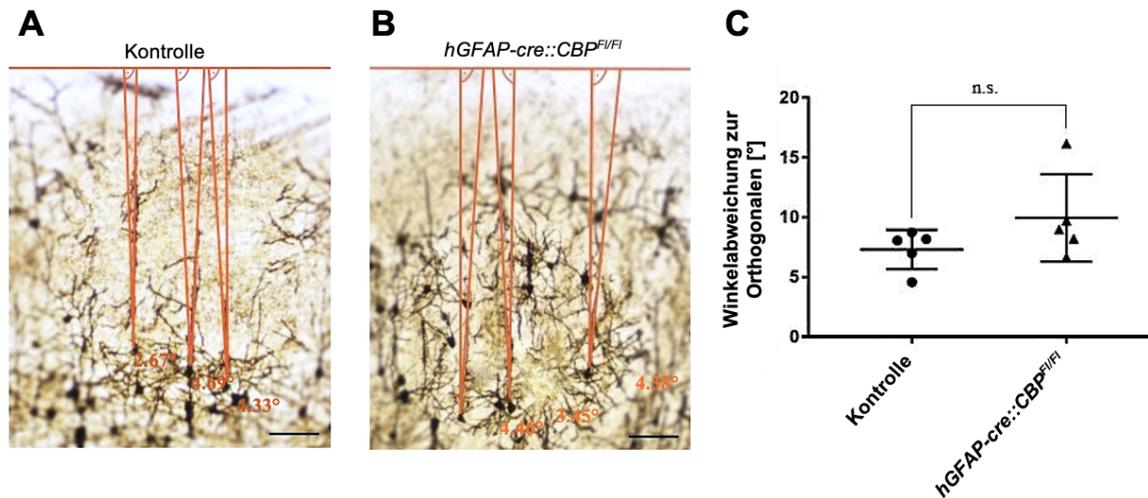


Abbildung 10: Die Orientierung der apikalen Dendriten von Pyramidenzellen in der Lamina V zur kortikalen Oberfläche zeigt keine signifikanten Veränderungen bei CBP-Defizienz im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von Golgi-Cox-gefärbten pyramidalen Neuronen im Kortex einer Wildtypkontrolle und einer *CBP*-mutierten Maus. Maßstabbalken: 100 μ m. **(C)** Quantifizierung der Orientierung der apikalen Dendriten der Wildtypkontrollen und der *CBP*-defizienten Mäuse. Die Orientierung wurde quantifiziert, indem der Winkel der apikalen Dendriten zur Orthogonalen der kortikalen Oberfläche gemessen wurde. Es wurde an fünf Kontrollen und fünf *CBP*-defizienten P30-Mäusen analysiert. $p = 0.179$.

Die Untersuchungen an den Golgi-Cox-gefärbten Gewebeschnitten hat ergeben, dass *CBP*-defiziente Neurone im Vergleich zur Kontrolle signifikant verkürzte Dendriten aufweisen. Trotzdem sind ihre Verzweigungen unverändert. Sie passen sich weder den kurzen Dendriten mit reduzierter Anzahl an sekundären dendritischen Ästen an, noch kompensieren sie die reduzierte Länge mit einer Expression vermehrter Verzweigungen. Bezüglich der Ausrichtung und Orientierung der Neurone konnte eine Tendenz, jedoch keine deutliche Veränderung dieser Komponente beobachtet werden.

4.3 Morphologie der dendritischen Dornfortsätze

4.3.1 Die Dichte der Dornfortsätze von Pyramidenzellen ist bei einer *CBP*-Mutation signifikant reduziert

Die Dornfortsätze der Neurone sind bedeutend im Lern- und Erinnerungsprozess wie einige Studien berichten konnten [152, 168, 169]. Untersuchungen an verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen zeigten eine verminderte Dichte an Spines auf den Dendriten [156, 210, 211]. Aufgrund der Berichte entschieden wir uns die Spines genauer zu untersuchen. Dabei wurden für jede Versuchsgruppe Pyramidenzellen von drei P30-Mäusen angeschaut. Von jedem Versuchstier wurden insgesamt 20 Neurone an beiden Hemisphären in der Region der Falx cerebri auf Höhe der Hippocampi analysiert. An den koronaren Schnitten der Golgi-Cox-gefärbten Neurone erfolgte die Messung am distalen Abschnitt des apikalen Dendriten, da sich an diesem Abschnitt der Dendriten der Großteil der Spines befindet [155, 156]. Die Messungen ergaben, dass die Dichte der Spines auf den apikalen Dendriten bei *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mäusen signifikant reduziert ist im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den oben genannten Studien und weist darauf hin, dass eine reduzierte Dichte der Spines mit einer Konsequenz der Hirnleistung einhergeht.

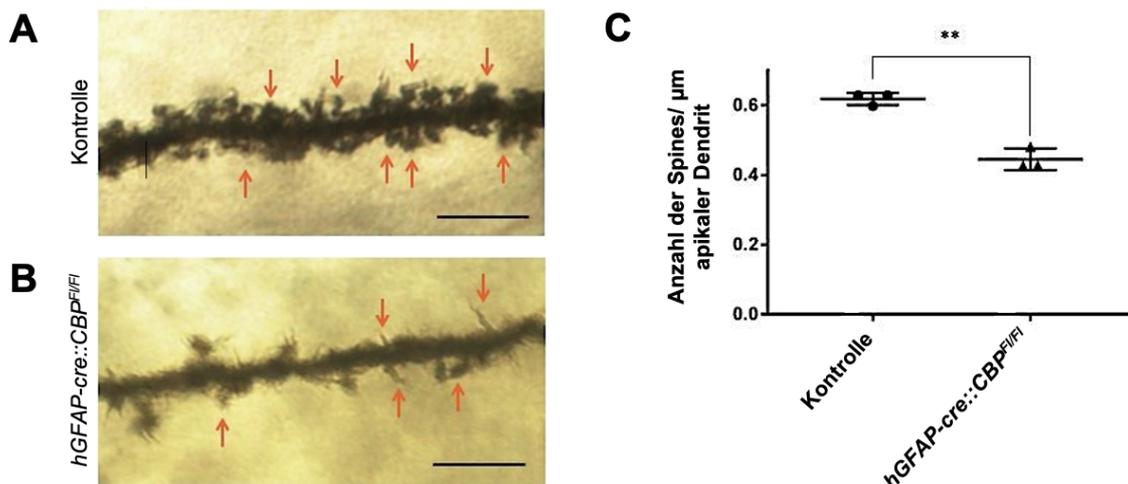


Abbildung 11: Die Dichte der Dornfortsätze ist in *CBP*-defizienten Neuronen signifikant reduziert im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von Golgi-Cox-gefärbten Pyramidenzellen bei einer Kontrolle und bei einer *CBP*-defizienten Maus. Maßstabbalken: 10 μm. **(C)** Quantifizierung der Spine-Dichte pro μm apikalen Dendriten von Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V zeigt eine signifikante Reduzierung der Spine-Dichte von Neuronen mit *CBP*-Defizienz im Vergleich zur Kontrolle. Die Spine-Dichte wurde an drei Kontrollen und drei *CBP*-defizienten P30-Mäusen ermittelt. **p < 0.01.

4.3.2 Pyramidenzellen mit CBP-Defizienz der kortikalen Lamina V zeigen Alterationen in der Morphologie der Dornfortsätze

Um die Morphologie der Neurone und die neuronale Funktion näher zu untersuchen, haben wir die Spines analysiert. Es wurden vier verschiedene Spine-Typen beschrieben, die möglicherweise die Ausreifung und Funktion der Spines widerspiegeln [141-143]. Es wird angenommen, dass die Differenzierung der Dornfortsätze mit dem Filopodia-Typ beginnen und die Ausreifung über die Thin- und Stubby-Typen bis hin zum Mushroom-Typ erfolgt (Abb. 12A) [141]. Bei den ausgereiften Typen, die Stubby- und Mushroom-geformten Spines, wird angenommen, dass sie stabiler sind und zum Gedächtnis- und Erinnerungsvermögen beitragen [168, 169]. Spines vom Filopodia- und Thin-Typen sind sehr dynamisch und tragen durch Initiierung von synaptischen Kontakten wahrscheinlich zum Lernprozess bei [165-169]. Wir haben ein gestörtes Gleichgewicht der Spine-Typen mit Verlagerung in Richtung der unausgereiften Dornfortsätze bei *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mäusen beobachtet (Abb. 12). Die Dichte der Mushroom-Spines war im CBP-defizienten Cortex signifikant erniedrigt, während der Anteil an unausgereiften Spines zunahm. Atypische Spines waren dabei nicht aufzufinden. Dies lässt vermuten, dass das korrekte Verhältnis der Spine-Typen eine wichtige Rolle in der kognitiven Leistung spielt.

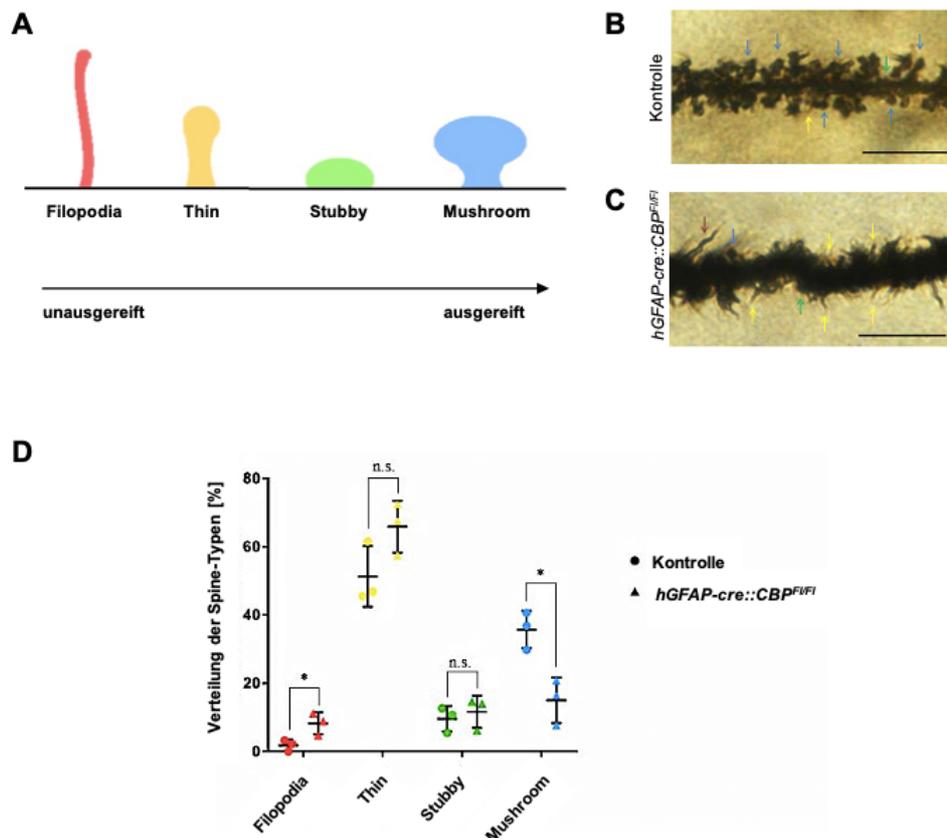


Abbildung 12: Die Ausreifung der Dornfortsätze in Neuronen ist bei CBP-Defizienz signifikant beeinträchtigt im Vergleich zum WT. (A) Schematische Abbildung der morphologischen Charakteristika der dendritischen Spines. Die Ausreifung der Spines erfolgt von den Filopodia-geformten Strukturen bis hin zu den kurzen, breitköpfigen Spines vom Mushroom-Typ. **(B und C)** Repräsentative Abbildungen von Golgi-Cox-gefärbten apikalen Dendriten von Pyramidenzellen in der kortikalen Lamina V in WT- und CBP-defizienten p30-Mäusen. Pfeile weisen auf die verschiedenen Spine-Typen hin, farbkodiert entsprechend (A). Maßstabbalken: 10 μm . **(D)** Quantifizierung der Verteilung der verschiedenen Spine-Typen von pyramidalen Neuronen in der kortikalen Lamina V mit CBP-Defizienz im Vergleich zum WT. * $p < 0.05$. (A) und (B und C) sind adaptiert von der Abbildung 1 aus Risher, W.C., et al., *Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e107591.

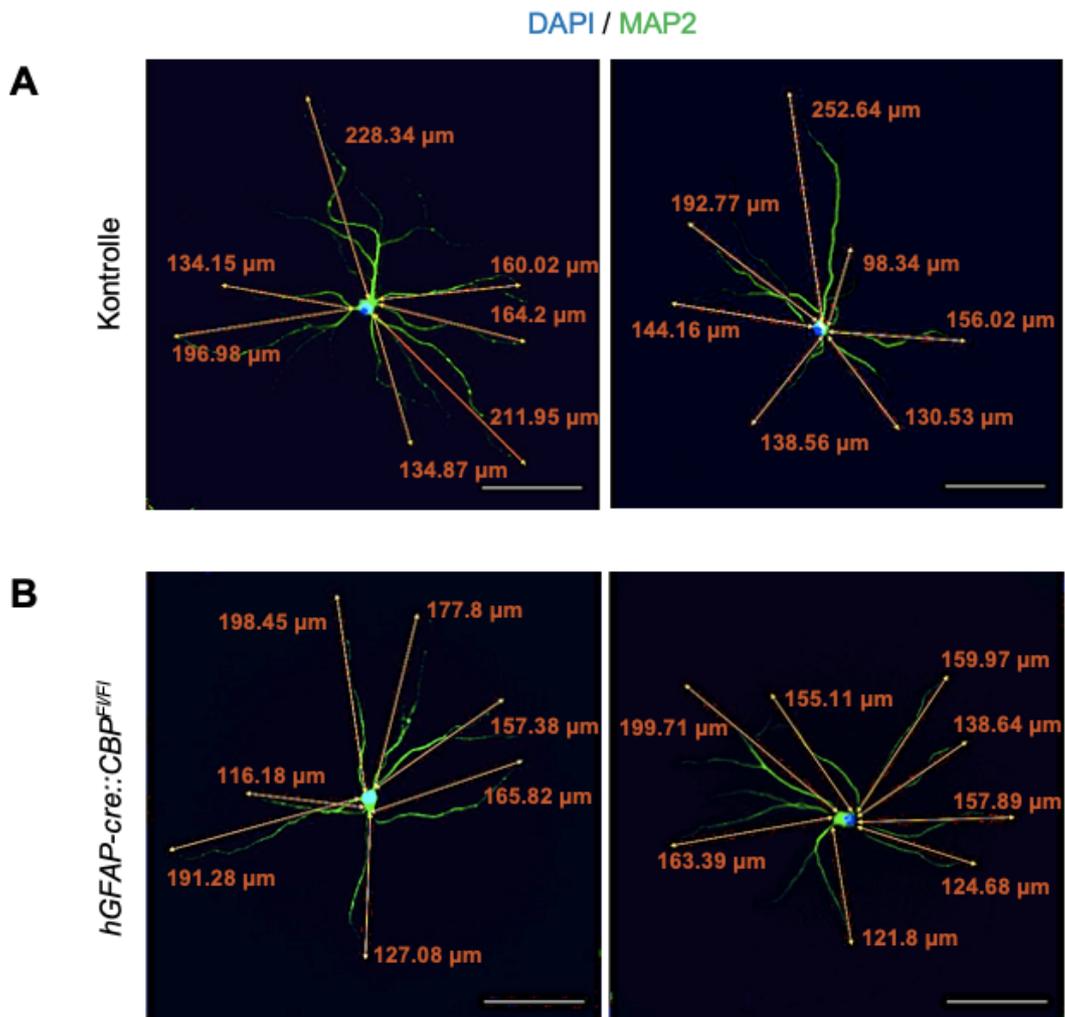
Die dendritischen Dornfortsätze im *hGFAP-cre::CBP^{F/F}*-Mausmodell waren auffällig verändert. Die Dichte der Spines auf den Dendriten ist signifikant reduziert. Weiterhin hat sich der Anteil der Spine-Typen zugunsten der unausgereiften Spine-Formen verschoben, so dass mehr Dornfortsätze vom Filopodia- und Thin-Typen als die vom Stubby- und Mushroom-Typen aufzufinden waren. Atypische Dornfortsätze wurden dabei nicht beobachtet.

4.4 Morphologie der CBP-defizienten Neurone in der Zellkultur

Zellkulturen sind eine geeignete Methode, um ein besseres Verständnis der Pathophysiologie von neurologischen Entwicklungsstörungen zu erhalten. Wir führten hier eine Zellkultur in Form einer modifizierten Version der Neuronen-Astrozyten-Sandwich-Co-Kultur nach Banker und Goslin (1998) durch, bei der die Polarisierung der Neurone mit der Entwicklung von apikalen und basalen Dendriten ermöglicht wird [223-225]. Die trophischen Bedingungen der astrozytären Feederzellen ermöglichten eine gesunde Kultur der Neurone. Die Neurone wurden nach 28 DIV fixiert und mithilfe von Fluoreszenzfärbungen dargestellt und analysiert. In dieser Zeit sind die Dendriten bereits ausgereift und können untersucht werden [227]. Die 2D-Natur der Neurone in Zellkultur ermöglichte eine vereinfachte Analyse.

4.4.1 Die Länge der neuronalen Dendriten ist bei einer CBP-Defizienz unverändert

In Studien wurde beschrieben, dass die Länge der Dendriten der Pyramidenzellen bei verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen verkürzt ist [230, 231]. In den Golgi-Cox-gefärbten Hirnschnitten konnten wir eine signifikante Verkürzung der Dendriten bei *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mäusen beobachten (siehe 4.2.1). Bei den kultivierten Neuronen zeigte sich eine Tendenz, jedoch keine signifikante Reduzierung der durchschnittlichen Dendritenlänge bei den *CBP*-mutierten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13). Eine Untersuchung der Neurone nach einem späteren Zeitpunkt hätte möglicherweise ein deutlicheres Ergebnis gezeigt, so dass weiterhin die Vermutung besteht, dass eine korrekte Ausbildung der neuronalen Dendriten bedeutend für die physiologische Hirnleistung ist.



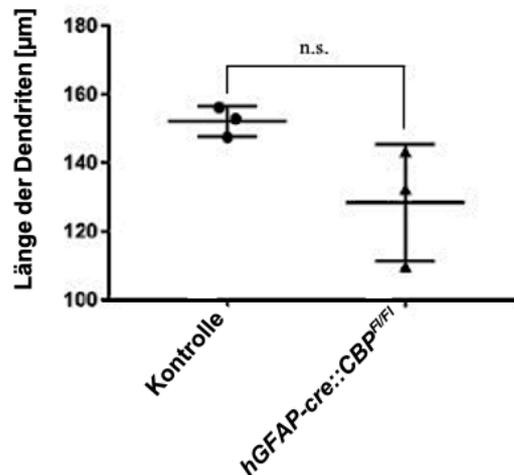
C

Abbildung 13: Die durchschnittliche Länge der Dendriten von CBP-defizienten, kortikalen Neuronen zeigt nach 28 DIV keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von kortikalen WT- und CBP-defizienten Neuronen. Die Neurone sind positiv für die Anti-MAP2-Antikörper-Färbung. Nuclei wurden mit DAPI gegengefärbt. Maßstabbalken: 100 μm. (C) Quantifizierung der durchschnittlichen Dendritenlänge von CBP-defizienten Neuronen im Vergleich zum WT nach 28 DIV. Für jede Versuchsgruppe wurden drei unabhängig voneinander ausgesäte Zellkulturen untersucht, von denen jeweils 20 Neurone ausgemessen wurden. $p = 0.1304$.

4.4.2 Die Anzahl der primären Dendriten ist bei einer CBP-Defizienz der Pyramidenzellen unverändert

Ergebnisse von Studien zeigten, dass die Anzahl der dendritischen Äste von kultivierten Neuronen bei verschiedenen neurologischen Entwicklungsstörungen mit ID reduziert ist [218-220]. Diese Publikationen sprechen also dafür, dass eine ausreichende Ausbildung der Dendriten notwendig ist, um eine physiologische kognitive Leistung zu gewähren. Dementsprechend untersuchten wir die Anzahl der primären Dendriten der Neurone. Im Gegensatz zu diesen Publikationen ergab die Untersuchung der Fluoreszenz-markierten Neurone keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl an primären Dendriten (Abb. 14).

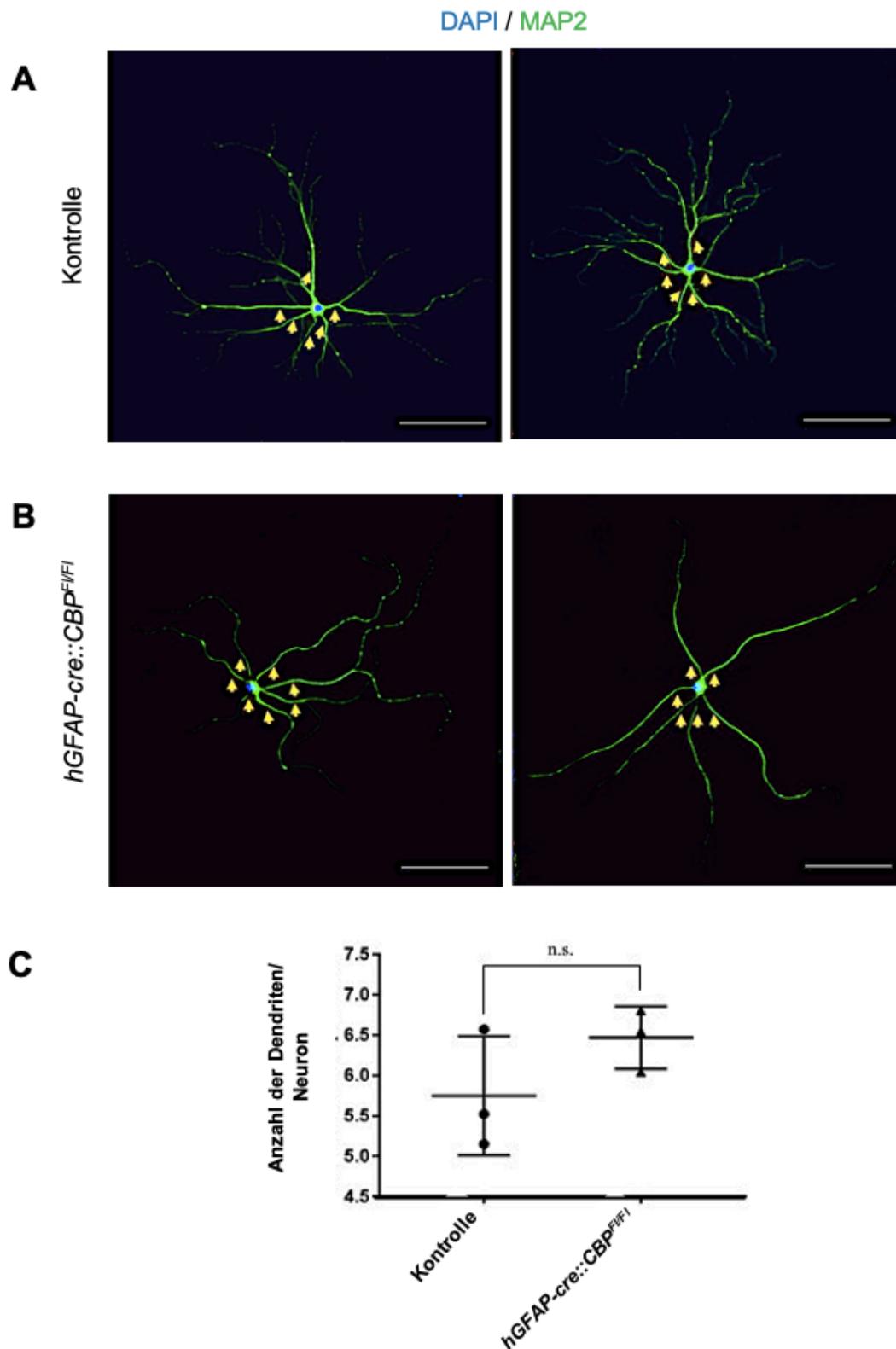
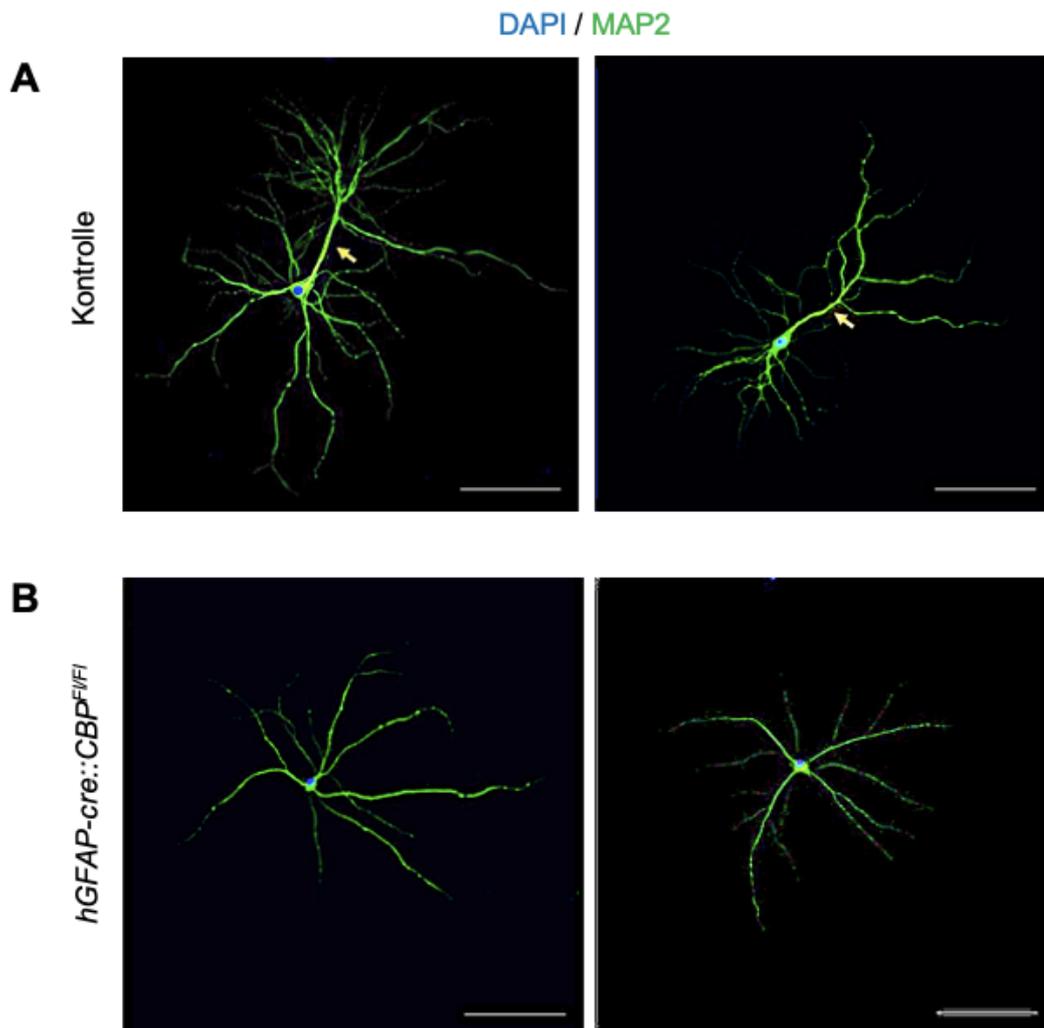


Abbildung 14: Die Anzahl der primären Dendriten pro Neuron mit CBP-Defizienz nach 28 DIV zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT. (A und B) Repräsentative Abbildungen von kortikalen WT- und CBP-defizienten Neuronen nach 28 DIV. Die Neurone sind positiv für die Anti-MAP2-Antikörper-Färbung. Nuclei wurden mit DAPI gegengefärbt. Pfeile weisen auf die primären Dendriten. Maßstabballen: 100 μ m. **(C)** Quantifizierung der Anzahl an primären

Dendriten von CBP-defizienten Neuronen im Vergleich zum WT. Für jede Versuchsgruppe wurden drei unabhängig voneinander ausgesäte Zellkulturen untersucht, von denen jeweils 20 Neurone ausgemessen wurden. $p = 0.2295$.

4.4.3 Der Anteil an ausgebildeten apikalen Dendriten ist unter den CBP-defizienten Neuronen signifikant erniedrigt

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Neurone war auffällig, dass der Anteil an Neuronen mit einem ausgebildeten apikalen Dendriten bei einer *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mutation niedriger war als bei der Kontrolle (Abb. 15). Die Ergebnisse zeigten, dass unter den CBP-defizienten Neuronen rund halb so viele Nervenzellen einen apikalen Dendriten ausgebildet haben wie die Neurone aus der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine Ausbildung des apikalen Dendriten und die damit einhergehende Richtung und Orientierung der Pyramidenzellen *in vivo* eine bedeutende Rolle in der mentalen Leistung spielen.



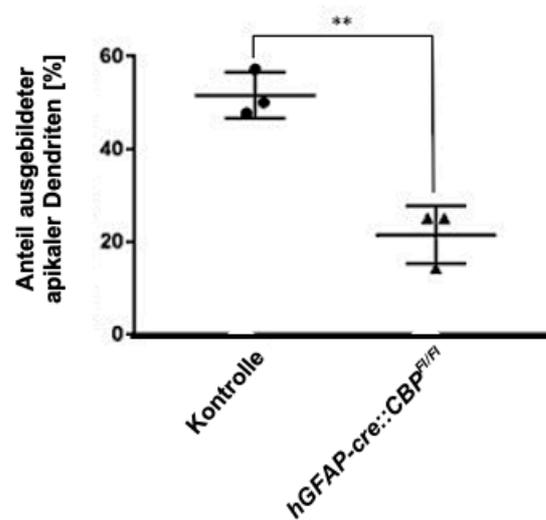
C

Abbildung 15: Der Anteil der Neurone, die apikale Dendriten exprimieren, ist bei einer CBP-Defizienz signifikant reduziert im Vergleich zum WT nach 28 DIV. (A und B) Repräsentative Abbildungen von krotikalen WT- und CBP-defizienten Neuronen nach 28 DIV. Die Neurone sind positiv für die Anti-MAP2-Antikörper-Färbung. Nuclei wurden mit DAPI gegengefärbt. Pfeile weisen auf die apikalen Dendriten. Maßstabbalken: 100 μ m. (C) Quantifizierung der Präsenz von apikalen Dendriten mit CBP-Defizienz im Vergleich zu WT. Für jede Versuchsgruppe wurden drei unabhängig voneinander ausgesäte Zellkulturen untersucht, von denen jeweils 20 Neurone ausgemessen wurden. ** $p = 0.0032$.

Die co-kultivierten Neurone zeigten zusammenfassend ähnliche Veränderungen wie die Golgi-Cox-imprägnierten Gewebeschnitte des *hGFAP-cre::CBP^{F/F}*-Mausmodells. Die Dendriten der Neurone tendierten zu einer deutlich verkürzten Länge. Dabei war sich die Ausprägung der sekundären Verzweigungen unauffällig. Schließlich haben wir die Ausbildung von apikalen Dendriten an den Neuronen als Ausdruck der korrekten Orientierung dieser Zellen untersucht. Wir haben dabei festgestellt, dass der Anteil an CBP-defizienten Neuronen mit einem apikalen Dendriten signifikant niedriger war als der bei den Kontrolltieren.

5. Diskussion

5.1 Das *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodell für das Rubinstein-Taybi-Syndrom

In dieser Arbeit haben wir mit dem *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodell eine ZNS-spezifische Depletion von CBP erzeugt. Mithilfe dieses Modells konnten wir zeigen, dass CBP ein wichtiger Faktor für die Ausbildung und Differenzierung der Neurone ist und im Zentrum der neuronalen Entwicklung steht. Vergangene Versuche mit konventionellen homozygoten *CBP*-Knockout-Mäusen haben zu einer verfrühten Letalität und damit einer erschwerten Untersuchung der Versuchstiere geführt [52-54]. Diese pränatale Überlebensunfähigkeit verhinderte die Analyse von CBP hinsichtlich der neuronalen Entwicklung [52-54]. Versuche mit heterozygoten *CBP*-Knockout-Versuchstieren zeigten zwar mit ihren veränderten Lern- und Erinnerungsvermögen sowie ihrer dokumentierten Mikrozephalie phänotypische Ähnlichkeiten zu RSTS-Patienten [236]. Jedoch war die weitere Untersuchung und Aussagekraft durch die ungewisse Restaktivität des CBP des verbliebenen Allels eingeschränkt [236]. Daher wurde für diese Arbeit ein homozygoter Gewebespezifischer *CBP*-Knockout verwendet. Damit war es möglich, die Rolle von CBP in der Entwicklung und Ausbildung der Neurone zu untersuchen und CBP-abhängige Entwicklungsprozesse zu identifizieren, die möglicherweise an der Pathogenese des RSTS und der in dieser Entwicklungsstörung charakteristischen mentalen Retardierung beteiligt sind.

5.2 Die Rolle des CBP in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung

5.2.1 CBP als Regulator der neuronalen Struktur

Es wird angenommen, dass CBP eine wichtige Rolle in der Regulation der Hirngröße spielt [1]. Schoof et al. wiesen mithilfe des *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodells die wichtige Rolle von CBP als Regulator der Neurogenese, Morphogenese der Neuronen und neuronalen Konnektivität nach [25]. Anhand von

heterozygoten *CBP*-Knockout-Mausmodellen und MRT-Untersuchungen von RSTS-Patienten konnte gezeigt werden, dass ein Defizit von *CBP* zu einer Mikrozephalie führt [33, 65, 66]. Eine Meta-Analyse, die 732 Patienten eingeschlossen hat, bestätigte, dass die Mikrozephalie ein charakteristisches Merkmal des RSTS ist [237]. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen an den HE-gefärbten Gewebeschnitten unseres *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodells für das RSTS. Auch auf mikroskopischer Ebene hat sich die Größe der Strukturen deutlich verändert. Die Golgi-Cox-gefärbten Dendriten der Pyramidenzellen in der kortikalen L5 sind signifikant verkürzt. Auch die kultivierten Neurone zeigten eine Tendenz zu verkürzten Dendriten. Der generelle Aufbau und die allgemeine Struktur dieser Zellen sind jedoch erhalten geblieben. Der Einfluss von *CBP* auf die Länge der Neurone wurde erst kürzlich in einem ähnlichen Mausmodell mit dem Nestin-Promoter beschrieben, dessen Phänotyp mit unseren Ergebnissen übereinstimmt [153]. Alari et al. (2018) haben anhand von iPSC-basierten, 42 DIV-Neuronen von RSTS-Patienten mit *CBP*- oder *p300*-Mutationen verkürzte Dendriten beobachtet. Die Untersuchungen an unseren co-kultivierten Neuronen nach 28 DIV aus dem *CBP*-defizienten Mausmodell haben gezeigt, dass die Nervenzellen eine Tendenz zur Ausbildung verkürzter Dendriten haben. Auch Studien an Neuronen anderer neurologischer Entwicklungsstörungen zeigten eine Veränderung der Dendritenlänge [230, 231, 238]. Diese Studien und unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Länge der Dendriten bedeutend für die kognitive Leistung ist und *CBP* ein wichtiger Faktor für die Regulation des Dendritenwachstums ist. Weiterhin haben wir den Dendritenbaum der Pyramidenzellen untersucht und beobachtet, dass sich die absolute Anzahl an dendritischen Verzweigungen bei *CBP*-defizienten Pyramidenzellen *in vivo* verringert hat. Bezieht man das Ausmaß der Verzweigungen in Relation zur Dendritenlänge, so ist aufgrund der verkürzten Dendriten sowohl in den Golgi-impregnierten Gewebeschnitten als auch bei den kultivierten Neuronen keine Veränderung zu sehen. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die grundsätzliche Architektur der Neuronen unter *CBP*-Defizit nicht verändert. Trotz der deutlich verkürzten Dendriten im *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodell gab es weder eine Reduzierung der Anzahl an Verzweigungen, noch fand eine Kompensation der verkürzten Dendriten durch Ausbildung vermehrter Verzweigungen statt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen von Studien an Neuronen *in vivo* und *in vitro* anderer Syndrome mit ID, z.B. Neurone beim Down-

und Rett-Syndrom sowie Schizophrenie und Autismus, die ebenfalls ein verändertes Verhalten der Verzweigungen dokumentiert haben [218-220, 230, 232, 239, 240]. Die Ergebnisse implizieren, dass CBP zwar an der Regulation der Dendritenlänge beteiligt ist, dessen Aktivität die Faktoren für die allgemeine Struktur der Pyramidenzellen jedoch nicht maßgebend beeinflusst.

Bezüglich einer normalen kognitiven Funktion haben Studien darauf hingewiesen, dass die neuronale Zellmigration sowie die Richtung und Orientierung der Neurone wichtig für die mentale Leistung ist [233-235]. Die Untersuchung der Golgi-Cox-gefärbten Hirnschnitte zeigte eine Tendenz zu einer deutlichen Veränderung der Ausrichtung der Neurone. Und auch die mutierten Neurone in der Zellkultur wiesen einen deutlich niedrigeren Anteil an Pyramidenzellen auf, die apikale Dendriten ausbildeten, der Zellfortsatz, der i.d.R. zur kortikalen Oberfläche ausgerichtet ist. Mit diesen Ergebnissen wird der Verdacht, dass die Neurone mit einer CBP-Defizienz eine Störung in der Ausrichtung und Orientierung erfahren, unterstützt.

5.2.2 Die Ausbildung und Ausreifung der Spines sind abhängig von CBP

Die pyramidalen Dornfortsätze, die den Großteil des exzitatorischen synaptischen Inputs im Cerebrum erhalten, haben eine essentielle Bedeutung im Lern- und Gedächtnisvermögen des Menschen [152]. Sie haben die Fähigkeit in ihrer Größe und Form stark zu variieren und weisen damit eine hohe Plastizität auf [130, 159]. Mit ihrer hochdynamischen Struktur, die ständig auf- und abgebaut wird, formen und verfeinern sie die neuronale Konnektivität und tragen so zum Lernen und Erinnern bei [152, 160-163]. Die ständige Zu- und Abnahme der Anzahl an Spines erfolgt als Zeichen der Adaptierung an die regelmäßig veränderte Umgebung der Dornfortsätze [140, 175]. Mit diesem Hintergrund kann angenommen werden, dass eine Vielzahl neurologischer Entwicklungsstörungen mit mentaler Retardierung u.a. mit morphologischen Veränderungen der pyramidalen Dornfortsätze einhergeht. Dieser Zusammenhang wurde z.B. in den Reviews von Nimchinsky et al (2002) und Nishiyama (2019) erläutert, die verschiedene Fehlbildungen der Spines in verschiedenen neurologische Syndromen gegenüber gestellt haben [140, 152].

Die Dichte der Dornfortsätze ist ein wichtiger Faktor des neuronalen Netzwerkes [241]. Steigt die Anzahl der Spines, so steigt auch die Menge der neuronalen Verbindungen und die Komplexität [242]. Daraus folgt, dass Störungen der Spine-Dichte Beeinträchtigungen im Netzwerk bedingen [241]. Am *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-

Mausmodell haben wir die Dornfortsätze an den Dendriten der Pyramidenzellen untersucht und feststellen können, dass die Dichte dieser Spines beim RSTS-Modell signifikant reduziert war im Vergleich zur Kontrolle. Auch Neuronen von Patienten mit Down-Syndrom haben vergleichsweise weniger dendritische Spines, sowohl bei jungen als auch bei älteren Patienten [210, 211, 243]. Eine weitere Studie, die die charakteristische Eigenschaft der pathologischen Veränderung der Spines bei neurologischen Entwicklungsstörungen mit ID unterstützt, untersuchte Pyramidenzellen im Hippocampus von Patienten mit Trisomie 21 [244]. Als Vergleichsgruppen dienten normale Kontrollen und Down-Syndrom-Patienten mit assoziierter Alzheimer-Krankheit. Dabei stellte die Arbeitsgruppe fest, dass die Spine-Dichte in den Geweben aller Patienten mit Down-Syndrom erniedrigt ist, wobei die Veränderungen bei Down-Syndrom-Patienten mit assoziierter Alzheimer-Krankheit schwerwiegender waren [244]. Auch der gegenteilige Fall ist bei einem Syndrom mit ID vorzuweisen: Untersuchungen an Autopsien von Gehirnen mit Fragilem X-Syndrom zeigten eine reduzierte Spine-Menge in L5-Pyramidenzellen [213]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der Spines bei Erkrankungen mit ID besonders betroffen ist und eine korrekte Dichte dieser wichtig für die kognitive Leistung ist. Aus unseren Ergebnissen lässt sich ableiten, dass CBP ein bedeutendes Protein für die Ausbildung und das Wachstum der Dornfortsätze ist. Eine weitere Fehlentwicklung, die durch den frühen Verlust von CBP verursacht wurde, ist die inkorrekte Ausbildung der Spine-Typen. Hier zeigte sich eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der unreifen Spine-Typen. Die Neurone mit CBP-Defizienz wiesen einen erhöhten Anteil an Spines vom Filopodia- und vom Thin-Typ auf, während der Anteil der Stubby- und Mushroom-Typen signifikant verringert war. Die unreifen Formen der Dornfortsätze sind sehr beweglich und vermutlich an der Initiierung von synaptischen Kontakten und am Lernprozess beteiligt [165-169]. Im Gegensatz dazu sind die ausgereiften Spines unbeweglicher, aber stabiler, und tragen zum Erinnerungsvermögen bei [168, 169]. Alle Mausmodelle für das RSTS haben ein Defizit des LTM und eine Einschränkung der mentalen Leistung aufgewiesen, passend zu den Beobachtungen an RSTS-Patienten, bei denen eine mentale Beeinträchtigung und ein Differenzierungsdefizit der Neuronen beschrieben wurde [1, 215-217]. Zahlreiche Studien haben bereits Veränderungen in der Balance der Spine-Anteile bei verschiedenen Entwicklungsstörungen mit mentaler Retardierung beschrieben. Marin-Padilla

(1976) hat mithilfe der Golgi-Färbung bei Patienten mit Down-Syndrom vermehrt verlängerte und verkürzte Spines beobachtet [245]. Auch die Neurone von Patienten mit Fragilem X-Syndrom wiesen ungewöhnlich lange Dornfortsätze auf [213, 214]. Ein weiteres Beispiel sind die Studien an Mausmodellen für das Rett-Syndrom, die einen reduzierten Anteil an Mushroom-Spines berichtet haben [207, 246]. Diese Studien zusammen mit den Ergebnissen aus unseren Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der korrekte Anteil der Spine-Typen eine essentielle Rolle in der Lern- und Gedächtnisbildung spielt und dass CBP ein wichtiger Faktor für die Ausbildung der Spine-Typen und damit für die kognitive Leistungsfähigkeit ist.

5.3 Implikationen für die Pathogenese des Rubinstein-Taybi-Syndroms

5.3.1 Mikrostrukturelle Veränderungen als Ursache der mentalen Retardierung und kognitiven Dysfunktion

Der Neokortex ist u.a. ein Substrat der mentalen Retardierung und kognitiven Dysfunktion bei RSTS-Patienten wie vergangene Studien postulieren [55, 56, 196]. Mit den Ergebnissen, die auf eine Assoziation der CBP-Defizienz mit einer Veränderung der mikrostrukturellen Neuroanatomie hinweisen, identifiziert diese Arbeit morphologische Pathologien der Dendriten und Dornfortsätze und hat so zur Kenntnis des CBP als bedeutendes Protein in der neuronalen Entwicklung beigesteuert.

Seit den frühen 1970ern haben Färbungsmethoden von Neuronen auf Veränderungen der Dendriten und Spines als Ursache genetischer und umweltbedingter mentaler Retardierung hingewiesen [209]. Dendritische Alterationen sind dabei die am konsistentesten anatomischen Strukturen, die in Studien von neurologischen Entwicklungsstörungen mit ID vorgewiesen wurden [247]. Es wurde in einer Vielzahl von Studien beschrieben, dass verschiedene neurologische Entwicklungsstörungen mit ID, z.B. das Down-, Rett- und Fragile X-Syndrom, mit einer veränderten Morphologie der Neuronen und Spines einhergehen [206-211, 247]. Die dort beschriebenen pathologischen Abweichungen in der Dendritenlänge, Spine-Dichte und Ausreifung der Spines stimmen mit

unseren Ergebnissen überein. Auch das in dieser Arbeit verwendete *hGFAP-cre::CBP^{F/FI}*-Mausmodell für das RSTS zeigte eine deutlich eingeschränkte Ausbildung der neuronalen Strukturen nach einem frühen Verlust von CBP. Die Ergebnisse werden durch die neuropathologischen Untersuchungen an Autopsien von RSTS-Patienten unterstützt, die alle verkleinerte und weniger differenzierte Neurone beschrieben haben [215-217]. Da jedoch nur vereinzelte und veraltete Studien an obduzierten RSTS-Gehirnen existieren, die v.a. durch die geringe Prävalenz der Erkrankung bedingt sind, ist ein tiefgreifendes Verständnis mithilfe von Mausmodellen notwendig. Die reduzierte Anzahl an Spines und das verschobene Gleichgewicht der Spine-Typen zugunsten der unreifen Dornfortsätze unterstützen die Hypothese, dass die Neuronen morphologisch und funktionell bzw. dass der Lern- und Erinnerungsprozess von CBP beeinflusst werden. Die vergangenen Studien und unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die strukturellen Veränderungen direkt mit funktionellen Störungen einhergehen und dass die CBP-Defizienz ein bedeutender Faktor für die mentale Retardierung des RSTS ist.

5.3.2 Die mentale Retardierung ist abhängig von der CBP-vermittelten Morphogenese

Vergangene Studien und die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die mentale Retardierung und kognitiven Defizite beim RSTS durch folgende CBP-abhängige Komponenten und Prozesse verursacht werden, die zu einer veränderten Morphologie der Neurone und Spines führen.

Ein Prozess spielt sich in der embryonalen Entwicklung des ZNS ab und ist mit der Rolle von *CBP* als epigenetisches Gen assoziiert [56, 153, 248]. Ein homozygoter *CBP*-Knockout von Mäusen führte durch eine Fehlbildung des Neuralrohrs zu einer verfrühten Letalität [52-54]. Wurde *CBP*, wie im Mausmodell dieser Arbeit, nach dem Beginn der Neurulation und Formation des Neuralrohrs ZNS-spezifisch ausgeschaltet, so ist die generelle Hirnstruktur erhalten geblieben. Jedoch wurden u.a. verkleinerte Hippocampi beobachtet, anatomische Strukturen, die bedeutend für die Gedächtniskonsolidierung sind. Diese Beobachtung ist vereinbar mit Studien, die gezeigt haben, dass eine reduzierte KAT-Aktivität zu Defiziten in der hippocampalen, synaptischen Plastizität und im Erinnerungsvermögen führt [194-196].

Ein weiterer CBP-abhängiger Faktor für die ID des RSTS bezieht sich auf die veränderte mikrostrukturelle Neuroanatomie der Betroffenen. Viele Studien haben bereits beschrieben, dass die Intelligenzminderung bei neuronalen Syndromen, wie im Rett-, Fragilen X- und Down-Syndrom, mit einer veränderten Morphologie der Neuronen und Dendriten assoziiert ist [206, 207, 210-214]. Die dort beschriebenen Veränderungen der neuronalen Morphologie, ähnlich wie die Befunde in den *hGFAPcre::CBP^{F1/F1}*-Mäusen, deuten auf eine wichtige, funktionelle Rolle der Struktur von Neuronen und Spines in der mentalen Retardierung hin. Die verringerte Dichte von Spines und damit einhergehende reduzierte Anzahl an Synapsen in CBP-defizienten Mäusen stärkt die Hypothese, dass Neurone morphologisch und funktionell von CBP abhängig sind.

Weiterhin wird die enzymatische Aktivität bzw. die KAT-Aktivität des CBP hinsichtlich der Gedächtniskonsolidierung lebenslang benötigt [55, 57, 58, 194]. Forscher haben mithilfe von heterozygoten *CBP*-Knockout-Mäusen gezeigt, dass die KAT-Aktivität des CBP bedeutend für die Ausbildung des LTM ist [63, 194-196]. Weitere Studien haben gezeigt, dass CBP über CREB-vermittelte Kinase-Stoffwechselwege am Lern- und Erinnerungsprozess beteiligt ist [199-201]. Der u.a. durch CBP-vermittelte Erhalt der synaptischen Plastizität ist also von essentieller Bedeutung für eine physiologische kognitive Leistung.

Insgesamt wirken also zahlreiche Prozesse in der Pathogenese des RSTS, die u.a. parallel verlaufen oder miteinander interferieren, und durch eine Einschränkung der Funktion von CBP oder seiner KAT-Aktivität beeinflusst werden. Sheikh und Akhtar (2019) haben in einem Review beschrieben, dass KATs vermutlich als Integratoren von Umweltfaktoren auf die Genexpression wirken [249]. Diese Eigenschaft ist u.a. für die Krankheitsentstehung und das Fortbestehen des RSTS interessant und sollte für ein besseres Verständnis weiter untersucht werden.

5.3 Ausblick

Für das weitere Verständnis der Pathogenese der mentalen Retardierung und kognitiven Dysfunktion sollten weitere Studien zum RSTS durchgeführt werden. Da bisher nur wenige Studien an Autopsien und RSTS-Patienten veröffentlicht wurden, sollten für ein tiefgreifendes Verständnis weitere Untersuchungen an Mausmodellen und autoptischen Hirnmaterialien erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Frage, in wieweit die Dendritenlänge und Orientierung der Neurone Einfluss auf ihre Aktivität und Kommunikation untereinander nimmt. Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Analyse der Funktion der einzelnen Spine-Typen. Die hier dargestellten Ergebnisse postulieren, dass ein Missverhältnis von unreifen und adulten Dornfortsätzen mit einer Verminderung kognitiver Fähigkeiten einhergeht. Mushroom- und Stubby-geformte Dornfortsätze scheinen bedeutend für die Ausbildung des Gedächtnisses zu sein, während die Filopodia- und Thin-Spines wichtig für den Lernprozess sind. Ausgehend von dieser Implikation bleibt zu untersuchen, welche genaue Rolle die unterschiedlich geformten Dornfortsätze in der kognitiven Leistung spielen und welche Faktoren auf ihre strukturelle und funktionelle Plastizität Einfluss nehmen. Um das Ausmaß der Korrelation zwischen der Dymorphologie der Neurone und der Schwere der mentalen Retardierung zu verstehen, sind weitere elektrophysiologische Untersuchungen der veränderten Neurone zu ergänzen. Die hier präsentierten Ergebnisse lassen vermuten, dass CBP ein bedeutender Faktor in der embryonalen Entwicklung des ZNS ist. Zudem lässt sich ableiten, dass die veränderte Morphologie der Neurone unter CBP-Defizit zu einer Einschränkung kognitiver Fähigkeiten führt. Zusätzliche Analysen des neuronalen Zytoskeletts in Abhängigkeit von CBP würden die Resultate unterstützen. Diese Fragestellungen zusammen mit den Erkenntnissen dieser Arbeit tragen zum molekularen Verständnis der Intelligenzminderung von RSTS bei, um Wege zu etablieren, die zukünftig diese oder ähnliche neuronale Entwicklungsstörungen präventiv oder symptomatisch therapieren können.

6. Zusammenfassung

Das Rubinstein-Taybi-Syndrom (RSTS) ist eine neurologische Entwicklungsstörung, die durch eine mentale Retardierung, einer Mikrozephalie sowie fazialen und körperlichen Anomalien charakterisiert ist. Ursächlich sind u.a. eine Mutationen des *CBP*- oder *p300*-kodierenden Gens, zwei homologe, ubiquitär exprimierte Ko-Aktivatoren für die Transkription mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität. Trotz verschiedener Studien mit Mausmodellen für das RSTS, die eine Assoziation von *CBP* mit der mentalen Retardierung beschreiben, bleibt das betroffene Substrat der kognitiven Dysfunktion ungeklärt. Um ein besseres Verständnis der Pathogenese des RSTS zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die Rolle von CBP in der neuronalen Entwicklung und Differenzierung untersucht. Dafür wurde ein zeitlich- und gewebespezifisches, homozygotes *CBP*-Knockout-Mausmodell verwendet, bei der mithilfe des cre-loxP-Systems das *CBP*-Gen in GFAP-exprimierenden neuronalen Progenitorzellen frühzeitig ausgeschaltet wurde. Der Einfluss von CBP auf die neuronale Entwicklung wurde mit der Golgi-Cox-Färbung und der Astrozyten-Neuronen-Sandwich-Co-Kultur untersucht.

In der Übersichtsaufnahme von HE-gefärbten Gewebeschnitten aus dem *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-Mausmodell zeigten sich dilatierte Ventrikel, verkleinerte Hippocampi sowie eine Mikrozephalie. Bei näherer Untersuchung mittels der Golgi-Cox-Methode konnten Alterationen der pyramidalen Dendriten und Dornfortsätze im Neokortex beobachtet werden. Die apikalen Dendriten sind deutlich verkürzt. Veränderungen der Spines stellten sich durch eine verringerte Dichte und eine Verschiebung der Anteile der Spine-Formen in Richtung der unausgereiften Spine-Typen dar. Die Analyse der kultivierten Neurone ergaben übereinstimmende Ergebnisse und zeigten zudem einen verringerten Anteil an Neuronen, die apikale Dendriten ausbilden. Dies lässt vermuten, dass die Zellmigration sowie die Ausrichtung und Orientierung der Neurone eine wichtige Bedeutung für die kognitive Funktion hat. Die vorliegende Arbeit, zusammen mit vergangenen Studien zu neurologischen Entwicklungsstörungen mit mentaler Retardierung und zur Rolle von *CBP* in der Entwicklung der Neurone, zeigt die Auswirkungen einer *CBP*-Defizienz auf die mikrostrukturelle Neuroanatomie und unterstützt die Vermutung, dass Mutationen des *CBP*-Gens eine zentrale Bedeutung in der beobachteten mentalen Retardierung und kognitiven Dysfunktion im RSTS zusteht.

7. Summary

Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS) is a neurodevelopmental disorder characterized by mental retardation, microcephaly and different facial and physical abnormalities. It is associated with mutations in the *CBP* and *p300* encoding genes, two homologous and ubiquitously expressed transcriptional co-activators with histone-acetyltransferase activity. Although a large number of publications with different mouse models for RSTS postulates an association of CBP with the mental retardation, anatomical substrates still remains unclear. To obtain a better knowledge about the pathogenesis of RSTS the role of CBP in the neural development and differentiation was analyzed in this work. A conditional, homozygous *CBP*-knockout mouse model was employed. With the cre-LoxP system in that model the *CBP* gene was knocked out in GFAP expressing neural progenitor cells at an early embryonic stage. To study the impact of CBP on the neuronal development Golgi-Cox staining and the astrocyte-neuron-sandwich-co-culture was conducted.

In the overview images of H&E stained brain slices of *hGFAP-cre::CBP^{F1/F1}*-mice alterations of different structures were striking: dilated ventricles, smaller hippocampi and a microcephaly were observed. To elucidate these changes further Golgi-Cox staining was performed and detected various alterations in the structure of pyramidal neurons in the neocortex. Apical dendrites were significantly shorter. Furthermore a reduced spine density and a disturbed balance of spine types showing a tendency towards the immature spines were observed. Analyses of the cultured neurons showed consistent results and revealed a reduced proportion of neurons developing apical dendrites, branched neuronal extensions which are orientated towards the cortical surface, indicating that the cell migration and orientation of the neurons play an important role in cognitive function. Together with past studies about neurodevelopmental disorders regarding mental retardation and the impact of CBP in neural development, this work shows the effects of CBP deficiency on the microstructural neuroanatomy and indicates that CBP is an essential protein in the context of the observed mental retardation and cognitive dysfunction of RSTS.

8. Literaturverzeichnis

1. Rubinstein, J.H. and H. Taybi, *Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome*. Am J Dis Child, 1963. **105**: p. 588-608.
2. Beets, L., C. Rodriguez-Fonseca, and R.C. Hennekam, *Growth charts for individuals with Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet A, 2014. **164A**(9): p. 2300-9.
3. Padfield, C.J., M.W. Partington, and N.E. Simpson, *The Rubinstein-Taybi syndrome*. Arch Dis Child, 1968. **43**(227): p. 94-101.
4. Bartsch, O., et al., *Inheritance and variable expression in Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(9): p. 2254-61.
5. Petrij, F., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 348-51.
6. Roelfsema, J.H. and D.J. Peters, *Rubinstein-Taybi syndrome: clinical and molecular overview*. Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(23): p. 1-16.
7. Fergelot, P., et al., *Phenotype and genotype in 52 patients with Rubinstein-Taybi syndrome caused by EP300 mutations*. Am J Med Genet A, 2016. **170**(12): p. 3069-3082.
8. Roelfsema, J.H., et al., *Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(4): p. 572-80.
9. Stevens, C.A., *Rubinstein-Taybi Syndrome*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
10. Hennekam, R.C., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome in The Netherlands*. Am J Med Genet Suppl, 1990. **6**: p. 17-29.
11. Rubinstein, J.H., *Broad thumb-hallux (Rubinstein-Taybi) syndrome 1957-1988*. Am J Med Genet Suppl, 1990. **6**: p. 3-16.

12. Wiley, S., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome medical guidelines*. Am J Med Genet A, 2003. **119A**(2): p. 101-10.
13. Gorlin, R.J., J.M.M. Cohen, and R.C.M. Hennekam, *Syndromes of the Head and Neck*. 4th ed. 2001, New York: Oxford Medical Press.
14. Stevens, C.A., J. Pouncey, and D. Knowles, *Adults with Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet A, 2011. **155A**(7): p. 1680-4.
15. van Genderen, M.M., et al., *Ocular features in Rubinstein-Taybi syndrome: investigation of 24 patients and review of the literature*. Br J Ophthalmol, 2000. **84**(10): p. 1177-84.
16. Stevens, C.A. and M.G. Bhakta, *Cardiac abnormalities in the Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet, 1995. **59**(3): p. 346-8.
17. Miller, R.W. and J.H. Rubinstein, *Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet, 1995. **56**(1): p. 112-5.
18. Hennekam, R.C., *Rubinstein-Taybi syndrome*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(9): p. 981-5.
19. Hennekam, R.C., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome in a mother and son*. Eur J Pediatr, 1989. **148**(5): p. 439-41.
20. Marion, R.W., D.M. Garcia, and J.B. Karasik, *Apparent dominant transmission of the Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet, 1993. **46**(3): p. 284-7.
21. Breuning, M.H., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome caused by submicroscopic deletions within 16p13.3*. Am J Hum Genet, 1993. **52**(2): p. 249-54.
22. Hennekam, R.C., et al., *Deletion at chromosome 16p13.3 as a cause of Rubinstein-Taybi syndrome: clinical aspects*. Am J Hum Genet, 1993. **52**(2): p. 255-62.
23. Imaizumi, K. and Y. Kuroki, *Rubinstein-Taybi syndrome with de novo reciprocal translocation t(2;16)(p13.3;p13.3)*. Am J Med Genet, 1991. **38**(4): p. 636-9.

24. Lacombe, D., et al., *Confirmation of assignment of a locus for Rubinstein-Taybi syndrome gene to 16p13.3*. Am J Med Genet, 1992. **44**(1): p. 126-8.
25. Schoof, M., et al., *The transcriptional coactivator and histone acetyltransferase CBP regulates neural precursor cell development and migration*. Acta Neuropathol Commun, 2019. **7**(1): p. 199.
26. Kalkhoven, E., et al., *Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(4): p. 441-50.
27. Schorry, E.K., et al., *Genotype-phenotype correlations in Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet A, 2008. **146A**(19): p. 2512-9.
28. Gervasini, C., et al., *High frequency of mosaic CREBBP deletions in Rubinstein-Taybi syndrome patients and mapping of somatic and germ-line breakpoints*. Genomics, 2007. **90**(5): p. 567-73.
29. Bartholdi, D., et al., *Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: delineation of the phenotype of the first patients carrying mutations in EP300*. J Med Genet, 2007. **44**(5): p. 327-33.
30. Bartsch, O., et al., *Two patients with EP300 mutations and facial dysmorphism different from the classic Rubinstein-Taybi syndrome*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(1): p. 181-4.
31. Negri, G., et al., *Clinical and molecular characterization of Rubinstein-Taybi syndrome patients carrying distinct novel mutations of the EP300 gene*. Clin Genet, 2015. **87**(2): p. 148-54.
32. Zimmermann, N., et al., *Confirmation of EP300 gene mutations as a rare cause of Rubinstein-Taybi syndrome*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(8): p. 837-42.
33. Ajmone, P.F., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome: New neuroradiological and neuropsychiatric insights from a multidisciplinary approach*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2018. **177**(4): p. 406-415.
34. Goodman, R.H. and S. Smolik, *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development*. Genes Dev, 2000. **14**(13): p. 1553-77.

35. Kwok, R.P., et al., *Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB*. *Nature*, 1994. **370**(6486): p. 223-6.
36. Lundblad, J.R., et al., *Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP*. *Nature*, 1995. **374**(6517): p. 85-8.
37. Arany, Z., et al., *A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein*. *Nature*, 1995. **374**(6517): p. 81-4.
38. Arany, Z., et al., *E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators*. *Cell*, 1994. **77**(6): p. 799-800.
39. Giles, R.H., et al., *Construction of a 1.2-Mb contig surrounding, and molecular analysis of, the human CREB-binding protein (CBP/CREBBP) gene on chromosome 16p13.3*. *Genomics*, 1997. **42**(1): p. 96-114.
40. Wydner, K.L., et al., *Localization of human CREB-binding protein gene (CREBBP) to 16p13.2-p13.3 by fluorescence in situ hybridization*. *Genomics*, 1995. **30**(2): p. 395-6.
41. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*. *Nature*, 1996. **384**(6610): p. 641-3.
42. Janknecht, R. and T. Hunter, *Versatile molecular glue. Transcriptional control*. *Curr Biol*, 1996. **6**(8): p. 951-4.
43. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. *Cell*, 1996. **87**(5): p. 953-9.
44. Chrivia, J.C., et al., *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. *Nature*, 1993. **365**(6449): p. 855-9.
45. Gu, W. and R.G. Roeder, *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*. *Cell*, 1997. **90**(4): p. 595-606.
46. Bedford, D.C., et al., *Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases*. *Epigenetics*, 2010. **5**(1): p. 9-15.

47. Giles, R.H., D.J. Peters, and M.H. Breuning, *Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease*. Trends Genet, 1998. **14**(5): p. 178-83.
48. Iyer, N.G., H. Ozdag, and C. Caldas, *p300/CBP and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4225-31.
49. Mullighan, C.G., et al., *CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 235-9.
50. Pasqualucci, L., et al., *Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 189-95.
51. Merk, D.J., et al., *Opposing Effects of CREBBP Mutations Govern the Phenotype of Rubinstein-Taybi Syndrome and Adult SHH Medulloblastoma*. Dev Cell, 2018. **44**(6): p. 709-724 e6.
52. Yao, T.P., et al., *Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300*. Cell, 1998. **93**(3): p. 361-72.
53. Oike, Y., et al., *Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(3): p. 387-96.
54. Tanaka, Y., et al., *Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10215-20.
55. Valor, L.M., et al., *Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability*. J Neurosci, 2011. **31**(5): p. 1652-63.
56. Wang, J., et al., *CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain*. Dev Cell, 2010. **18**(1): p. 114-25.
57. Barrett, R.M., et al., *Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(8): p. 1545-56.

58. Chen, G., et al., *CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation*. J Neurosci, 2010. **30**(39): p. 13066-77.
59. Lopez-Atalaya, J.P., L.M. Valor, and A. Barco, *Epigenetic factors in intellectual disability: the Rubinstein-Taybi syndrome as a paradigm of neurodevelopmental disorder with epigenetic origin*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **128**: p. 139-76.
60. Tanaka, Y., et al., *Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein*. Mech Dev, 2000. **95**(1-2): p. 133-45.
61. Tsui, D., et al., *CBP regulates the differentiation of interneurons from ventral forebrain neural precursors during murine development*. Dev Biol, 2014. **385**(2): p. 230-41.
62. Zhang, Z., et al., *Generation of a conditional allele of the CBP gene in mouse*. Genesis, 2004. **40**(2): p. 82-9.
63. Alarcon, J.M., et al., *Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration*. Neuron, 2004. **42**(6): p. 947-59.
64. Kung, A.L., et al., *Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP*. Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 272-7.
65. Ateca-Cabarga, J.C., et al., *Brain size regulations by cbp haploinsufficiency evaluated by in-vivo MRI based volumetry*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16256.
66. Milani, D., et al., *Rubinstein-Taybi syndrome: clinical features, genetic basis, diagnosis, and management*. Ital J Pediatr, 2015. **41**: p. 4.
67. Lee, S., et al., *Retinoid signaling and neurogenin2 function are coupled for the specification of spinal motor neurons through a chromatin modifier CBP*. Neuron, 2009. **62**(5): p. 641-54.
68. Medrano-Fernandez, A., et al., *The Epigenetic Factor CBP Is Required for the Differentiation and Function of Medial Ganglionic Eminence-Derived Interneurons*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(6): p. 4440-4454.

69. Alari, V., et al., *iPSC-derived neurons of CREBBP- and EP300-mutated Rubinstein-Taybi syndrome patients show morphological alterations and hypoexcitability*. Stem Cell Res, 2018. **30**: p. 130-140.
70. Del Blanco, B., et al., *CBP and SRF co-regulate dendritic growth and synaptic maturation*. Cell Death Differ, 2019. **26**(11): p. 2208-2222.
71. Iwase, S., et al., *Epigenetic Etiology of Intellectual Disability*. J Neurosci, 2017. **37**(45): p. 10773-10782.
72. Lipinski, M., B. Del Blanco, and A. Barco, *CBP/p300 in brain development and plasticity: disentangling the KAT's cradle*. Curr Opin Neurobiol, 2019. **59**: p. 1-8.
73. Florio, M. and W.B. Huttner, *Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex*. Development, 2014. **141**(11): p. 2182-94.
74. Semple, B.D., et al., *Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species*. Prog Neurobiol, 2013. **106-107**: p. 1-16.
75. Stiles, J. and T.L. Jernigan, *The basics of brain development*. Neuropsychol Rev, 2010. **20**(4): p. 327-48.
76. Sun, T. and R.F. Hevner, *Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations*. Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(4): p. 217-32.
77. Brodmann, K., *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde: in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. 1909, Leipzig: Barth.
78. Mountcastle, V.B., *The columnar organization of the neocortex*. Brain, 1997. **120 (Pt 4)**: p. 701-22.
79. Rakic, P., *Confusing cortical columns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12099-100.
80. Vogt, O., *Zur anatomischen Gliederung des Cortex cerebri*. Psychologie und Neurologie 2, 1903: p. 160-180.

81. Ramon y Cajal, S., *Comparative study of the sensory areas of the human cortex*. 1899, Worcester, ENG: Worcester.
82. Purves, D., et al., *An Overview of Cortical Structure*, in *Neuroscience*. 2001, Sinauer Associates: Sunderland, MA.
83. Douglas, R.J. and K.A. Martin, *Neuronal circuits of the neocortex*. *Annu Rev Neurosci*, 2004. **27**: p. 419-51.
84. Gilbert, C.D. and T.N. Wiesel, *Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex*. *Nature*, 1979. **280**(5718): p. 120-5.
85. Shepherd, G.M. and T.B. Rowe, *Neocortical Lamination: Insights from Neuron Types and Evolutionary Precursors*. *Front Neuroanat*, 2017. **11**: p. 100.
86. Marin-Padilla, M. and T.M. Marin-Padilla, *Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex. A Golgi study*. *Anat Embryol (Berl)*, 1982. **164**(2): p. 161-206.
87. Jones, E.G., *Cerebral Cortex*, in *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Academic Press.
88. Muralidhar, S., Y. Wang, and H. Markram, *Synaptic and cellular organization of layer 1 of the developing rat somatosensory cortex*. *Front Neuroanat*, 2013. **7**: p. 52.
89. Ramon y Cajal, S., *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. *History of Neuroscience*, ed. 7. Vol. 2. 1995, Oxford, ENG: Oxford University Press.
90. Del Rio, J.A., et al., *A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections*. *Nature*, 1997. **385**(6611): p. 70-4.
91. Marin-Padilla, M., *Origin, formation, and prenatal maturation of the human cerebral cortex: an overview*. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1990. **10**(2): p. 137-46.
92. Marin-Padilla, M., *Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex*. *Trends Neurosci*, 1998. **21**(2): p. 64-71.

93. Marin-Padilla, M., [*The development of the human cerebral cortex. A cytoarchitectonic theory*]. *Rev Neurol*, 1999. **29**(3): p. 208-16.
94. Portera-Cailliau, C., et al., *Diverse modes of axon elaboration in the developing neocortex*. *PLoS Biol*, 2005. **3**(8): p. e272.
95. Rowland, D.C., et al., *Functional properties of stellate cells in medial entorhinal cortex layer II*. *Elife*, 2018. **7**.
96. Varga, C., S.Y. Lee, and I. Soltesz, *Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(7): p. 822-4.
97. Miller, K.D., *Understanding layer 4 of the cortical circuit: a model based on cat V1*. *Cereb Cortex*, 2003. **13**(1): p. 73-82.
98. Fuchs, E.C., et al., *Local and Distant Input Controlling Excitation in Layer II of the Medial Entorhinal Cortex*. *Neuron*, 2016. **89**(1): p. 194-208.
99. Kitamura, T., et al., *Island cells control temporal association memory*. *Science*, 2014. **343**(6173): p. 896-901.
100. Pesold, C., et al., *Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(6): p. 3221-6.
101. Winterer, J., et al., *Excitatory Microcircuits within Superficial Layers of the Medial Entorhinal Cortex*. *Cell Rep*, 2017. **19**(6): p. 1110-1116.
102. Canto, C.B. and M.P. Witter, *Cellular properties of principal neurons in the rat entorhinal cortex. II. The medial entorhinal cortex*. *Hippocampus*, 2012. **22**(6): p. 1277-99.
103. Schubert, D., et al., *Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons*. *J Neurosci*, 2003. **23**(7): p. 2961-70.
104. Simons, D.J. and T.A. Woolsey, *Morphology of Golgi-Cox-impregnated barrel neurons in rat Sml cortex*. *J Comp Neurol*, 1984. **230**(1): p. 119-32.

105. Harris, K.D. and G.M. Shepherd, *The neocortical circuit: themes and variations*. Nat Neurosci, 2015. **18**(2): p. 170-81.
106. Scala, F., et al., *Layer 4 of mouse neocortex differs in cell types and circuit organization between sensory areas*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4174.
107. Jones, E.G., *Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization*. Neuroscience, 1998. **85**(2): p. 331-45.
108. Armstrong-James, M., K. Fox, and A. Das-Gupta, *Flow of excitation within rat barrel cortex on striking a single vibrissa*. J Neurophysiol, 1992. **68**(4): p. 1345-58.
109. Petersen, C.C. and B. Sakmann, *Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8435-46.
110. Baker, A., et al., *Specialized Subpopulations of Deep-Layer Pyramidal Neurons in the Neocortex: Bridging Cellular Properties to Functional Consequences*. J Neurosci, 2018. **38**(24): p. 5441-5455.
111. Levesque, M., et al., *Corticostriatal projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons*. Brain Res, 1996. **709**(2): p. 311-5.
112. Veinante, P., P. Lavallee, and M. Deschenes, *Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissal barrel cortex in the rat*. J Comp Neurol, 2000. **424**(2): p. 197-204.
113. Hattox, A.M. and S.B. Nelson, *Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties*. J Neurophysiol, 2007. **98**(6): p. 3330-40.
114. Aronoff, R., et al., *Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(12): p. 2221-33.
115. Agmon, A. and B.W. Connors, *Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex*. J Neurosci, 1992. **12**(1): p. 319-29.

116. Meyer, H.S., et al., *Cell type-specific thalamic innervation in a column of rat vibrissal cortex*. Cereb Cortex, 2010. **20**(10): p. 2287-303.
117. Wimmer, V.C., et al., *Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissal cortex*. Cereb Cortex, 2010. **20**(10): p. 2265-76.
118. Oberlaender, M., et al., *Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex*. Cereb Cortex, 2012. **22**(10): p. 2375-91.
119. Constantinople, C.M. and R.M. Bruno, *Deep cortical layers are activated directly by thalamus*. Science, 2013. **340**(6140): p. 1591-4.
120. Rah, J.C., et al., *Thalamocortical input onto layer 5 pyramidal neurons measured using quantitative large-scale array tomography*. Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 177.
121. Naka, A. and H. Adesnik, *Inhibitory Circuits in Cortical Layer 5*. Front Neural Circuits, 2016. **10**: p. 35.
122. Markram, H., et al., *Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry*. Cell, 2015. **163**(2): p. 456-92.
123. Thomson, A.M., *Neocortical layer 6, a review*. Front Neuroanat, 2010. **4**: p. 13.
124. Larkum, M.E., et al., *A Perspective on Cortical Layering and Layer-Spanning Neuronal Elements*. Front Neuroanat, 2018. **12**: p. 56.
125. Elston, G.N., *Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function*. Cereb Cortex, 2003. **13**(11): p. 1124-38.
126. DeFelipe, J. and I. Farinas, *The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs*. Prog Neurobiol, 1992. **39**(6): p. 563-607.
127. Valverde, F., *Intrinsic neocortical organization: some comparative aspects*. Neuroscience, 1986. **18**(1): p. 1-23.

128. DeFelipe, J. and E.G. Jones, *High-Resolution Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry of Colocalized GABA and Calbindin D-28k in Somata and Double Bouquet Cell Axons of Monkey Somatosensory Cortex*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(1): p. 46-60.
129. Wang, Y., et al., *A simplified morphological classification scheme for pyramidal cells in six layers of primary somatosensory cortex of juvenile rats*. IBRO Rep, 2018. **5**: p. 74-90.
130. Spruston, N., *Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(3): p. 206-21.
131. Gray, E.G., *Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex*. Nature, 1959. **183**(4675): p. 1592-3.
132. Harris, K.M. and S.B. Kater, *Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function*. Annu Rev Neurosci, 1994. **17**: p. 341-71.
133. Shepherd, G.M., *The dendritic spine: a multifunctional integrative unit*. J Neurophysiol, 1996. **75**(6): p. 2197-210.
134. Gao, W.J. and Z.H. Zheng, *Target-specific differences in somatodendritic morphology of layer V pyramidal neurons in rat motor cortex*. J Comp Neurol, 2004. **476**(2): p. 174-85.
135. Kasper, E.M., et al., *Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets*. J Comp Neurol, 1994. **339**(4): p. 459-74.
136. Kroon, T., et al., *Early postnatal development of pyramidal neurons across layers of the mouse medial prefrontal cortex*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 5037.
137. Romand, S., et al., *Morphological development of thick-tufted layer v pyramidal cells in the rat somatosensory cortex*. Front Neuroanat, 2011. **5**: p. 5.
138. Zhu, J.J., *Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites*. J Physiol, 2000. **526 Pt 3**: p. 571-87.

139. Ramon y Cajal, S., *Estructura de los centros nerviosos de las aves*. 1888: Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.
140. Nimchinsky, E.A., B.L. Sabatini, and K. Svoboda, *Structure and function of dendritic spines*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 313-53.
141. Risher, W.C., et al., *Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e107591.
142. Peters, A. and I.R. Kaiserman-Abramof, *The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines*. *Am J Anat*, 1970. **127**(4): p. 321-55.
143. Skoff, R.P. and V. Hamburger, *Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord*. *J Comp Neurol*, 1974. **153**(2): p. 107-47.
144. Cooper GM (2000) „The Cell“, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
145. Matus, A., *Actin-based plasticity in dendritic spines*. *Science*, 2000. **290**(5492): p. 754-8.
146. Bar, J., et al., *Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37136.
147. D'Este, E., et al., *STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons*. *Cell Rep*, 2015. **10**(8): p. 1246-51.
148. Konietzny, A., J. Bar, and M. Mikhaylova, *Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations*. *Front Cell Neurosci*, 2017. **11**: p. 147.
149. Xu, K., G. Zhong, and X. Zhuang, *Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons*. *Science*, 2013. **339**(6118): p. 452-6.
150. Emes, R.D., et al., *Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity*. *Nat Neurosci*, 2008. **11**(7): p. 799-806.
151. Frank, R.A. and S.G. Grant, *Supramolecular organization of NMDA receptors and the postsynaptic density*. *Curr Opin Neurobiol*, 2017. **45**: p. 139-147.

152. Nishiyama, J., *Plasticity of dendritic spines: Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders*. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2019. **73**(9): p. 541-550.
153. Del Blanco, B., et al., *CBP and SRF co-regulate dendritic growth and synaptic maturation*. *Cell Death Differ*, 2019.
154. Penzes, P., et al., *Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(3): p. 285-93.
155. Valverde, F., *Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse*. *Exp Brain Res*, 1967. **3**(4): p. 337-52.
156. Marin-Padilla, M. and G.R. Stibitz, *Distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells of the hamster neocortex*. *Brain Res*, 1968. **11**(3): p. 580-92.
157. Elston, G.N., *Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with*. *J Neurosci*, 2000. **20**(18): p. RC95.
158. Jacobs, B., et al., *Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative golgi study*. *Cereb Cortex*, 2001. **11**(6): p. 558-71.
159. Sorra, K.E. and K.M. Harris, *Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines*. *Hippocampus*, 2000. **10**(5): p. 501-11.
160. Grutzendler, J., N. Kasthuri, and W.B. Gan, *Long-term dendritic spine stability in the adult cortex*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 812-6.
161. Holtmaat, A.J., et al., *Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo*. *Neuron*, 2005. **45**(2): p. 279-91.
162. Pfeiffer, T., et al., *Chronic 2P-STED imaging reveals high turnover of dendritic spines in the hippocampus in vivo*. *Elife*, 2018. **7**.
163. Trachtenberg, J.T., et al., *Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 788-94.

164. Holtmaat, A., et al., *Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 979-83.
165. Lendvai, B., et al., *Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo*. Nature, 2000. **404**(6780): p. 876-81.
166. Dunaevsky, A., et al., *Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13438-43.
167. Ziv, N.E. and S.J. Smith, *Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation*. Neuron, 1996. **17**(1): p. 91-102.
168. Bourne, J. and K.M. Harris, *Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?* Curr Opin Neurobiol, 2007. **17**(3): p. 381-6.
169. Kasai, H., et al., *Structure-stability-function relationships of dendritic spines*. Trends Neurosci, 2003. **26**(7): p. 360-8.
170. Cruz-Martin, A., M. Crespo, and C. Portera-Cailliau, *Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice*. J Neurosci, 2010. **30**(23): p. 7793-803.
171. Fiala, J.C., J. Spacek, and K.M. Harris, *Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?* Brain Res Brain Res Rev, 2002. **39**(1): p. 29-54.
172. Desmond, N.L. and W.B. Levy, *Synaptic correlates of associative potentiation/depression: an ultrastructural study in the hippocampus*. Brain Res, 1983. **265**(1): p. 21-30.
173. Matsuzaki, M., et al., *Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 761-6.
174. Nagerl, U.V., et al., *Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons*. Neuron, 2004. **44**(5): p. 759-67.
175. Okamoto, K., et al., *Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity*. Nat Neurosci, 2004. **7**(10): p. 1104-12.

176. Zhou, Q., K.J. Homma, and M.M. Poo, *Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses*. *Neuron*, 2004. **44**(5): p. 749-57.
177. Parnavelas, J.G., et al., *Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation*. *Nature*, 1974. **248**(5443): p. 71-3.
178. Peters, A. and E.G. Jones, *Cerebral Cortex: Development and Maturation of Cerebral Cortex*. 1st ed. 1988, New York: Plenum Press. 133-166.
179. Huttenlocher, P.R., *Dendritic development and mental defect*. *Neurology*, 1970. **20**(4): p. 381.
180. Yuste, R. and T. Bonhoeffer, *Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(1): p. 24-34.
181. Sotelo, C., *Purkinje cell ontogeny: formation and maintenance of spines*. *Prog Brain Res*, 1978. **48**: p. 149-70.
182. Hirano, A. and H.M. Dembitzer, *Cerebellar alterations in the weaver mouse*. *J Cell Biol*, 1973. **56**(2): p. 478-86.
183. Rakic, P. and R.L. Sidman, *Organization of cerebellar cortex secondary to deficit of granule cells in weaver mutant mice*. *J Comp Neurol*, 1973. **152**(2): p. 133-61.
184. Sotelo, C., *Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. II. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuits in the weaver mouse*. *Brain Res*, 1975. **94**(1): p. 19-44.
185. Sotelo, C., *Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice*. *J Exp Biol*, 1990. **153**: p. 225-49.
186. Miller, M. and A. Peters, *Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons*. *J Comp Neurol*, 1981. **203**(4): p. 555-73.
187. Vaughn, J.E., *Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system*. *Synapse*, 1989. **3**(3): p. 255-85.

188. Fiala, J.C., et al., *Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8900-11.
189. Josselyn, S.A. and P.V. Nguyen, *CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2005. **4**(5): p. 481-97.
190. Stork, O. and H. Welzl, *Memory formation and the regulation of gene expression*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(4): p. 575-92.
191. Bailey, C.H. and M. Chen, *Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in Aplysia*. J Neurosci, 1989. **9**(5): p. 1774-80.
192. Guan, Z., et al., *Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure*. Cell, 2002. **111**(4): p. 483-93.
193. Davis, H.P. and L.R. Squire, *Protein synthesis and memory: a review*. Psychol Bull, 1984. **96**(3): p. 518-59.
194. Korzus, E., M.G. Rosenfeld, and M. Mayford, *CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation*. Neuron, 2004. **42**(6): p. 961-72.
195. Viosca, J., et al., *Syndromic features and mild cognitive impairment in mice with genetic reduction on p300 activity: Differential contribution of p300 and CBP to Rubinstein-Taybi syndrome etiology*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(1): p. 186-94.
196. Wood, M.A., et al., *Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage*. Learn Mem, 2005. **12**(2): p. 111-9.
197. Jessberger, S., et al., *Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats*. Learn Mem, 2009. **16**(2): p. 147-54.
198. Sahay, A., et al., *Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 466-70.

199. Abel, T., et al., *Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory*. *Cell*, 1997. **88**(5): p. 615-26.
200. Atkins, C.M., et al., *The MAPK cascade is required for mammalian associative learning*. *Nat Neurosci*, 1998. **1**(7): p. 602-9.
201. Bito, H., K. Deisseroth, and R.W. Tsien, *CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression*. *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1203-14.
202. Miller, M.W., *Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1993. **17**(2): p. 304-14.
203. Miller, M.W., *Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996. **20**(1): p. 139-43.
204. Ikonomidou, C., et al., *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome*. *Science*, 2000. **287**(5455): p. 1056-60.
205. Valenzuela, C.F., et al., *Does moderate drinking harm the fetal brain? Insights from animal models*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(5): p. 284-92.
206. Bassell, G.J. and S.T. Warren, *Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function*. *Neuron*, 2008. **60**(2): p. 201-14.
207. Baj, G., et al., *Developmental and maintenance defects in Rett syndrome neurons identified by a new mouse staging system in vitro*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 18.
208. Purpura, D.P., *Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation*. *Science*, 1974. **186**(4169): p. 1126-8.
209. Huttenlocher, P.R., *Dendritic and synaptic pathology in mental retardation*. *Pediatr Neurol*, 1991. **7**(2): p. 79-85.

210. Suetsugu, M. and P. Mehraein, *Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study.* Acta Neuropathol, 1980. **50**(3): p. 207-10.
211. Takashima, S., et al., *Dendrites, dementia and the Down syndrome.* Brain Dev, 1989. **11**(2): p. 131-3.
212. Rehder, H. and B. Fritz, [*Genetic causes of mental retardation*]. Wien Med Wochenschr, 2005. **155**(11-12): p. 258-67.
213. Irwin, S.A., et al., *Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination.* Am J Med Genet, 2001. **98**(2): p. 161-7.
214. Rudelli, R.D., et al., *Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings.* Acta Neuropathol, 1985. **67**(3-4): p. 289-95.
215. Coffin, G.S., *Brachydactyly, Peculiar Facies and Mental Retardation.* Am J Dis Child, 1964. **108**: p. 351-9.
216. Fukunaga, N., et al., *Rubinstein-Taybi's syndrome-a case report.* Acta Pathol Jpn, 1969. **19**(4): p. 501-10.
217. Pogacar, S., N.F. Nora, and T.L. Kemper, *Neuropathological findings in the rubinstein-taybi syndrome.* R I Med J, 1973. **56**(3): p. 114-21.
218. Kim, D.S., et al., *Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD.* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 109.
219. Linda, K., C. Fiuza, and N. Nadif Kasri, *The promise of induced pluripotent stem cells for neurodevelopmental disorders.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2018. **84**(Pt B): p. 382-391.
220. Nagy, J., et al., *Altered neurite morphology and cholinergic function of induced pluripotent stem cell-derived neurons from a patient with Kleefstra syndrome and autism.* Transl Psychiatry, 2017. **7**(7): p. e1179.
221. Huttenlocher, P.R., *Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms.* Neurology, 1974. **24**(3): p. 203-10.

222. Zhuo, L., et al., *hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo*. *Genesis*, 2001. **31**(2): p. 85-94.
223. Brewer, G.J. and C.W. Cotman, *Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen*. *Brain Res*, 1989. **494**(1): p. 65-74.
224. Kaech, S. and G. Banker, *Culturing hippocampal neurons*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2406-15.
225. Banker, G. and K. Goslin, *Culturing Nerve Cells*. 1998, Cambridge, MA: MIT Press.
226. Beaudoin, G.M., 3rd, et al., *Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex*. *Nat Protoc*, 2012. **7**(9): p. 1741-54.
227. L'Episcopo, F., et al., *GSK-3beta-induced Tau pathology drives hippocampal neuronal cell death in Huntington's disease: involvement of astrocyte-neuron interactions*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**: p. e2206.
228. Golgi, C., *Sulla struttura della sostanza grigia del cervello*. Vol. 33. 1873, Lombardia: Gazzetta Medica Italiana.
229. Zaqout, S. and A.M. Kaindl, *Golgi-Cox Staining Step by Step*. *Front Neuroanat*, 2016. **10**: p. 38.
230. Dierssen, M., et al., *Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment*. *Cereb Cortex*, 2003. **13**(7): p. 758-64.
231. Armstrong, D., et al., *Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995. **54**(2): p. 195-201.
232. Armstrong, D.D., K. Dunn, and B. Antalffy, *Decreased dendritic branching in frontal, motor and limbic cortex in Rett syndrome compared with trisomy 21*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998. **57**(11): p. 1013-7.
233. Guerrini, R. and E. Parrini, *Neuronal migration disorders*. *Neurobiol Dis*, 2010. **38**(2): p. 154-66.

234. Guerrini, R., W.B. Dobyns, and A.J. Barkovich, *Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options*. Trends Neurosci, 2008. **31**(3): p. 154-62.
235. Robain, O. and T. Deonna, *Pachygyria and congenital nephrosis disorder of migration and neuronal orientation*. Acta Neuropathol, 1983. **60**(1-2): p. 137-41.
236. Barco, A., *The Rubinstein-Taybi syndrome: modeling mental impairment in the mouse*. Genes Brain Behav, 2007. **6 Suppl 1**: p. 32-9.
237. Cantani, A. and D. Gagliosi, *Rubinstein-Taybi syndrome. Review of 732 cases and analysis of the typical traits*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 1998. **2**(2): p. 81-7.
238. Becker, L., et al., *Growth and development of the brain in Down syndrome*. Prog Clin Biol Res, 1991. **373**: p. 133-52.
239. Koyama, Y., et al., *Alterations in dendrite and spine morphology of cortical pyramidal neurons in DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) knockout mice*. Front Neuroanat, 2015. **9**: p. 52.
240. Hattori, T., et al., *A novel DISC1-interacting partner DISC1-Binding Zinc-finger protein: implication in the modulation of DISC1-dependent neurite outgrowth*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(4): p. 398-407.
241. He, C.X. and C. Portera-Cailliau, *The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity*. Neuroscience, 2013. **251**: p. 120-8.
242. Yuste, R., *Dendritic spines and distributed circuits*. Neuron, 2011. **71**(5): p. 772-81.
243. Takashima, S., et al., *Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study*. Brain Res, 1981. **225**(1): p. 1-21.
244. Ferrer, I. and F. Gullotta, *Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus*. Acta Neuropathol, 1990. **79**(6): p. 680-5.

245. Marin-Padilla, M., *Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study.* J Comp Neurol, 1976. **167**(1): p. 63-81.
246. Chao, H.T., H.Y. Zoghbi, and C. Rosenmund, *MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number.* Neuron, 2007. **56**(1): p. 58-65.
247. Kaufmann, W.E. and H.W. Moser, *Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation.* Cereb Cortex, 2000. **10**(10): p. 981-91.
248. Wang, F., C.B. Marshall, and M. Ikura, *Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(21): p. 3989-4008.
249. Sheikh, B.N. and A. Akhtar, *The many lives of KATs - detectors, integrators and modulators of the cellular environment.* Nat Rev Genet, 2019. **20**(1): p. 7-23.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: CBP und P300 sind homologe transkriptionelle Co-Aktivatoren mit KAT-Aktivität.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der kortikalen Laminae und ihrer Zellen im Golgi-Cox-gefärbten Gewebeschnitt.	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pyramidenzellen aus den kortikalen Laminae II/ III und V.	10
Abbildung 4: Die wesentlichen Schritte der drei Spinogenese-Modelle.	14
Abbildung 5: Das hGFAP-cre::cbpFI/FI-Mausmodell.....	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Astrozyten-Neuronen-Sandwich-Co-Kultur.	22
Abbildung 7: Koronare Hirnschnitte in HE-Färbung von p30-Mäusen.	29
Abbildung 8: Die Länge der Dendriten sind signifikant kürzer bei CBP-defizienten Neuronen im Vergleich zum WT.	30
Abbildung 9: Die Anzahl an dendritischen Verzweigungen von CBP-defizienten Pyramidenzellen der kortikalen Lamina V zeigt keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum WT.....	31
Abbildung 10: Orientierung der apikalen Dendriten von Pyramidenzellen in der Lamina V zur kortikalen Oberfläche zeigt keine signifikanten Veränderungen bei CBP-Defizienz im Vergleich zum WT.	32
Abbildung 11: Die Dichte der Dornfortsätze ist in CBP-defizienten Neuronen signifikant reduziert im Vergleich zum WT.	33
Abbildung 12: Die Ausreifung der Dornfortsätze in Neuronen ist bei CBP-Defizienz signifikant beeinträchtigt im Vergleich zum WT.....	34
Abbildung 13: Durchschnittliche Länge der Dendriten von CBP-defizienten, kortikalen Neuronen zeigt nach 28 DIV keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT.	36
Abbildung 14: Anzahl der primären Dendriten pro Neuron mit CBP-Defizienz nach 28 DIV zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT.	38
Abbildung 15: Anteil der Neurone, die apikale Dendriten exprimieren, ist bei einer CBP-Defizienz signifikant reduziert im Vergleich zum WT nach 28 DIV.	39

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Primer-Sequenzen und PCR-Zyklen für die Genotypisierung.	21
Tabelle 2: Medien und Lösungen für die Präparation der Zellen.	24
Tabelle 3: Zellkulturzusätze und Stammlösungen zum Ansatz der Co-Kultur.	25

11. Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
CBP	cyclic AMP-response element binding protein binding protein
DAPI	4'6-diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DIV	days in vitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPBS-T	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline mit 0,3 % Triton X-100
Exx	embryonaler Tag xx
FBS	fetale bovine serum
FUDR	5-fluorodesoxyuridine
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GGM	glial growth medium
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGMD	Human Gene Mutation Database (Qiagen Bioinformatics)
ID	intellectual disability
i.d.R.	in der Regel
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
KAT	lysine acetyltransferase
LTD	long-term depression
LTM	long-term memory
LTP	long-term potentiation
MAP2	microtubule-associated protein 2
NMM	neural maintenance medium
p300	adenovirus early region 1A-associated protein
PSD	postsynaptic density
Pxx	postnataler Tag xx
RSTS	Rubinstein-Taybi-Syndrom
STM	short-term memory
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
u.a.	unter anderem

v.a.	vor allem
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Ulrich Schüller bedanken, Professor für molekulare pädiatrische Neuroonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, der mir die Möglichkeit gegeben hat unter seiner Leitung diese Arbeit zu verfassen. Die großartige Unterstützung mit der stetigen Diskussion und Motivation haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Besonderen Dank geht an Dr. Melanie Schoof, Postdoktorandin am Kinderkrebs-Zentrum Hamburg, für die hervorragende Betreuung und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die wesentlich für das Gelingen und die Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch möchte ich mich an die Arbeitsgruppe für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung und wertvollen Anregungen während der experimentellen Versuche bedanken.

Und schließlich geht mein Dank an Dr. Reimer Rudolph, Leiter der Technologieplattform des Heinrich-Pette-Instituts Hamburg, und Dr. Antonio Virgilio Failla, Leiter der Microscopy Imaging Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Einführung in die moderne Mikroskopie und die Übermittlung der Motivation und Begeisterung für die mikroskopische Arbeit.

13. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

14. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.