

mgr Joanna Julia Chmielewska

**Regulacja ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach
fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Magdalena Dziembowska

Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej,
Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Słowa kluczowe w języku polskim:

neuroliginy, zespół łamliwego chromosomu X, FMRP, lokalna translacja, synapsa, proteoliza

Słowa kluczowe w języku angielskim:

neuroligins, fragile X syndrome, FMRP, local translation, synapse, proteolysis

Nazwa i numer projektu badawczego

Badania naukowe do niniejszej rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone dzięki wsparciu finansowemu z grantów z Narodowego Centrum Nauki: Sonata Bis 2014/14/E/NZ3/00375 dr hab. Magdaleny Dziembowskiej i Preludium 2017/27/N/NZ1/01381 mgr Joanny Chmielewskiej.

Ponadto, za osiągnięcia naukowe m.in. będące wynikiem realizacji projektu doktorskiego Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej przyznała Joannie Chmielewskiej stypendium START 2020.

Część wyników zawartych w niniejszej pracy doktorskiej została opublikowana w postaci artykułu naukowego: Chmielewska JJ, Kuzniewska B, Milek J, Urbanska K, Dziembowska M. Neuroligin 1, 2 and 3 regulation as the synapse: FMRP-dependent translation and activity-induced proteolytic cleavage. *Molecular Neurobiology*. 2019 Apr;56(4):2741-2759. doi: 10.1007/s12035-018-1243-1. Epub 2018 Jul 28 (IF = 4,586, MNiSW = 100).

Wyniki pracy doktorskiej były również prezentowane podczas krajowych oraz międzynarodowych konferencji naukowych w postaci prezentacji ustnych oraz plakatowych.

Dedykacje

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania dla dr hab. Magdaleny Dziembowskiej za możliwość wykonywania projektu naukowego, poświęcony czas, cierpliwość, dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem, cenne uwagi merytoryczne oraz opiekę naukową podczas realizacji pracy doktorskiej.

Dziękuję wszystkim członkom Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej za przyjazną atmosferę pracy oraz praktyczne wskazówki.

Wyrażam szczególne podziękowania dla mojej rodziny i najbliższych za miłość, zrozumienie i wsparcie podczas tego etapu w moim życiu.

Spis treści

Spis treści.....	5
Spis rycin	9
Spis tabel.....	15
Wykaz stosowanych skrótów.....	16
Streszczenie w języku polskim	21
Streszczenie w języku angielskim	24
1. Wstęp	27
1.1. Komórka nerwowa i synapsa	27
1.2. Biologia przekazywania impulsu nerwowego	28
1.3. Plastyczność strukturalna i plastyczność synaptyczna	28
1.4. Białka adhezyjne na synapsie	30
1.5. Charakterystyka białek neuroligin	31
1.5.1. Synaptyczna specyfikacja neuroligin.....	31
1.5.2. Domenowa budowa neuroligin	32
1.5.3. Dimeryzacja neuroligin i kierowanie na błonę postsynaptyczną.....	33
1.5.4. Podstawowe funkcje neuroligin i charakterystyka myszy pozbawionych ekspresji neuroligin.....	34
1.5.5. Oddziaływanie neuroligin z innymi białkami.....	36
1.5.5.1. Neureksyny – główny partner neuroligin	36
1.5.5.2. Kompleks neuroligin i neureksyn na synapsie	38
1.5.5.3. Oddziaływanie neuroligin z receptorami i innymi białkami synaptycznymi	39
1.5.6. Proteoliza neuroligin i znaczenie tego procesu w rozwoju nowotworów mózgu.....	41
1.5.7. Neuroliginy w komórkach glejowych.....	42
1.5.8. Mutacje w genach neuroligin są przyczyną zaburzeń ze spektrum autyzmu	43
1.5.9. Charakterystyka wybranych mutacji w genach neuroligin.....	44
1.5.9.1. Mutacja <i>Nlgn3</i> ^{R451C}	44
1.5.9.2. Mutacja <i>Nlgn4X</i> ^{R704C}	45
1.6. Zaburzenia ze spektrum autyzmu	46
1.6.1. Epidemiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu	46
1.6.2. Obraz kliniczny i diagnostyka zaburzeń ze spektrum autyzmu.....	47
1.6.3. Klasyfikacja zaburzeń ze spektrum autyzmu.....	48
1.6.4. Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu	48
1.6.5. Syndromiczne zaburzenia ze spektrum autyzmu.....	49

1.6.6. Niesyndromiczne zaburzenia ze spektrum autyzmu	50
1.6.7. Poszukiwanie przyczyn zaburzeń ze spektrum autyzmu	53
1.6.8. Strategie terapeutyczne w zaburzeniach ze spektrum autyzmu	53
1.7. Zespół łamliwego chromosomu X - model syndromicznego autyzmu.....	55
1.7.1. Objawy kliniczne zespołu łamliwego chromosomu X.....	56
1.7.2. Etiologia i diagnostyka zespołu łamliwego chromosomu X.....	56
1.8. Charakterystyka białka zespołu łamliwego chromosomu X (FMRP).....	58
1.8.1. Ekspresja białka FMRP w komórkach mózgu	58
1.8.2. Struktura białka FMRP i wiązanie RNA.....	59
1.8.3. Funkcje białka FMRP.....	61
1.9. Transport mRNA i lokalna translacja w dendrytach.....	64
1.10. Badania nad molekularnym podłożem zespołu łamliwego chromosomu X..	65
1.10.1. Myszy <i>Fmr1</i> KO - model zespołu łamliwego chromosomu X u ludzi ...	65
1.10.2. Nieprawidłowości w morfologii kolców dendrytycznych w zespole łamliwego chromosomu X	66
1.11. Regulacja ekspresji neuroligin przez białko FMRP - uzasadnienie tematyki badań	67
2. Założenia i cel pracy	69
3. Materiały i metody	70
3.1. Lista buforów i roztworów	70
3.2. Zwierzęta	71
3.3. Genotypowanie.....	73
3.4. Izolacja synaptoneurosomów z hipokampa i kory mózgu myszy.....	74
3.5. Stymulacja receptorów NMDA <i>in vitro</i> na synaptoneurosomach	75
3.6. Inkubacja synaptoneurosomów z inhibitorami proteaz.....	75
3.7. Pomiar stężenia białka.....	76
3.8. Współwytrącanie RNA	76
3.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	77
3.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym.....	78
3.11. Pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych	79
3.12. Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> i barwienia immunofluorescencyjne.....	80
3.13. Chemiczne sieciowanie białek powierzchniowych z użyciem BS ³ w synaptoneurosomach i hodowlach neuronów hipokampalnych.....	81
3.14. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach.....	82
3.15. Deglikozylacja białek.....	83
3.16. Elektroforeza białek SDS-PAGE i Western Blot.....	83

3.17. Profilowanie polirybosomów, izolacja RNA, qRT-PCR i obliczenia	85
3.18. Detekcja nowo zsyntetyzowanych białek za pomocą chemii Click-iT	86
3.19. Analiza statystyczna	88
4. Wyniki	89
4.1. Charakterystyka zastosowanych modeli badawczych – synaptoneurosomów i pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych.....	89
4.2. Ocena poziomu ekspresji neuroligin w mózgu myszy o genotypie dzikim i <i>Fmr1</i> KO.....	91
4.2.1. Porównanie poziomu białka neuroliginy 1, 2 i 3 w synaptoneurosomach izolowanych z myszy typu dzikiego i <i>Fmr1</i> KO	92
4.2.2. Porównanie poziomu białka neuroliginy 1, 2, 3 w pierwotnej hodowli neuronalnej z myszy typu dzikiego oraz <i>Fmr1</i> KO.....	95
4.2.3. Porównanie poziomu mRNA <i>Nlgn1</i> , <i>Nlgn2</i> , <i>Nlgn3</i> w synaptoneurosomach z myszy typu dzikiego oraz <i>Fmr1</i> KO.....	97
4.3. Ocena oddziaływania białka FMRP z mRNA neuroligin.....	99
4.3.1. Identyfikacja sekwencji tworzących G-kwartet w mRNA <i>Nlgn1</i> , <i>Nlgn2</i> , <i>Nlgn3</i>	99
4.3.2. Zbadanie oddziaływania białka FMRP z mRNA <i>Nlgn1</i> , <i>Nlgn2</i> , <i>Nlgn3</i> w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy o genotypie dzikim i <i>Fmr1</i> KO	100
4.3.3. Zbadanie współwystępowania białka FMRP z mRNA <i>Nlgn1</i> , <i>Nlgn2</i> , <i>Nlgn3</i> w pierwotnej szczurzej hodowli neuronalnej.....	103
4.4. Charakterystyka zależnej od aktywności dystrybucji neuroligin w synapsie – wzmożone kierowanie białek NLGN1 i NLGN3 na błonę postsynaptyczną myszy <i>Fmr1</i> KO.....	108
4.4.1. Neuroligina 1	111
4.4.1.1. Sieciowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach	111
4.4.1.2. Sieciowanie białek powierzchniowych na komórkach nerwowych w pierwotnych hodowlach hipokampalnych	115
4.4.1.3. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach	116
4.4.1.4. Deglikozylacja białek neuroligin w synaptoneurosomach	118
4.4.2. Neuroligina 3	120
4.4.2.1. Sieciowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach	120
4.4.2.2. Sieciowanie białek powierzchniowych w pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych.....	122
4.4.2.3. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach	123
4.4.3. Neuroligina 2	125
4.4.3.1. Sieciowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach.....	125
4.4.3.2. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach	128

4.5. Charakterystyka cięcia proteolitycznego neuroligin	129
4.5.1. Zbadanie zależnego od aktywności synaptycznej cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach myszy WT i <i>Fmr1</i> KO	129
4.5.2. Weryfikacja specyficzności przeciętych fragmentów NLGN3 z użyciem myszy <i>Nlgn3</i> KO	133
4.5.3. Próba identyfikacji proteaz odpowiedzialnych za cięcie proteolityczne neuroligin	134
4.5.3.1. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin <i>in silico</i>	134
4.5.3.2. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach WT w obecności inhibitora GM60001 lub MMP-9/13	137
4.5.3.3. Zbadanie zależnego od aktywności synaptycznej cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach myszy WT i <i>Mmp-9</i> KO	140
4.5.3.4. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin 3 w synaptoneurosomach <i>Mmp-9</i> KO w obecności inhibitora GM6001 lub MMP-9/13	142
4.6. Podsumowanie uzyskanych wyników	144
5. Dyskusja	147
5.1. Ocena poziomu ekspresji neuroligin w mózgu myszy o genotypie dzikim i <i>Fmr1</i> KO	149
5.4. Ocena oddziaływania białka FMRP z mRNA neuroligin	151
5.5. Charakterystyka zależnej od aktywności dystrybucji neuroligin w synapsie – wzmożone kierowanie białek NLGN1 i NLGN3 na błonę postsynaptyczną myszy <i>Fmr1</i> KO	156
5.6. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin	160
6. Wnioski	167
7. Piśmiennictwo	168

Spis rycin

Rycina 1. Schemat komórki nerwowej i synapsy.

Rycina 2. Rodzaje kolców dendrytycznych i schemat ich dojrzewania oraz przebudowy.

Rycina 3. Schemat synapsy prezentujący złożoność synapsy pobudzającej i hamującej wraz z niektórymi białkami adhezyjnymi oraz receptorami.

Rycina 4. Lokalizacja poszczególnych izoform neuroligin na synapsach pobudzających i hamujących.

Rycina 5. Domenowa budowa białek neuroligin.

Rycina 6. Zestawienie stanu obecnej wiedzy na temat dimeryzacji neuroligin.

Rycina 7. Domenowa budowa białek neureksyn.

Rycina 8. Model atomowy schematycznie prezentujący trójwymiarową strukturę heterotertameru składającego się z dimeru neuroliginy 1 i dwóch monomerów neureksyny 1 β .

Rycina 9. Poziom ekspresji RNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* w poszczególnych komórkach kory mózgowej myszy i człowieka zmierzony za pomocą metody sekwencjonowania RNA.

Rycina 10. Schemat przedstawiający zmiany zachodzące w obrębie genu *fmr1* u osoby z FXS.

Rycina 11. Poziom ekspresji transkryptu *Fmr1* w poszczególnych komórkach kory mózgowej myszy i człowieka zmierzony za pomocą metody sekwencjonowania RNA.

Rycina 12. Schemat przedstawiający domeny białka FMRP.

Rycina 13. Przykładowa struktura G-kwartetu tworzona przez sekwencje mRNA bogate w guaninę.

Rycina 14. Schemat ilustrujący zatrzymywanie rybosomu przez białko FMRP podczas translacji, co prowadzi do podwyższonej ekspresji białek i zaburzenia funkcji synaptycznych w zespole łamliwego chromosomu X.

Rycina 15. Trójwymiarowa rekonstrukcja zdjęcia z mikroskopu konfokalnego dendrytów hipokampa wyizolowanych z myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO.

Rycina 16. Schemat izolacji synaptoneurosomów z mózgu myszy.

Rycina 17. Charakterystyka izolowanych frakcji – homogenatów i synaptoneurosomów – za pomocą metody Western blot.

Rycina 18. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne poziomu białka NLGN1, NLGN2 i NLGN3 w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 19. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne poziomu białka β 3-TUBULINY w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 20. Analiza wzbogacenia białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 w synaptoneurosomach za pomocą metody Western blot.

Rycina 21. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne poziomu białka NLGN1, NLGN2, NLGN3 w neuronach hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli założonej z osesków myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 22. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne poziomu białka β 3-TUBULINY w neuronach hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli założonej z mózgow myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 23. Porównanie poziomu mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*, *Psd-95* (kontrola pozytywna) oraz *Gapdh* (kontrola negatywna) w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.

Rycina 24. Analiza Western blot pokazująca obecność białka FMRP we frakcji wejściowej (input) oraz w próbkach współwytrąconych z białkiem FMRP (FMRP IP) uzyskanych z synaptoneurosomów myszy o genotypie dzikim i brak białka FMRP w próbkach z myszy *Fmr1* KO.

Rycina 25. Poziom wzbogacenia mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*, *Psd-95* i *Gapdh* po współwytrącaniu z przeciwciałem anti-FMRP 7G1-1 (FMRP IP) oraz kontrolnym przeciwciałem anti-IgG (IgG IP) zmierzony metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 26. Wyniki analiz *in silico* przeprowadzonych za pomocą programu QGRS Mapper w celu wyszukania sekwencji bogatych w G w regionie szczytowej sekwencji kodującej genu (CDS) i 3' UTR transkryptów *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* użytych do zaprojektowania sond do FISH.

Rycina 27. Fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja z użyciem antysensownych sond dla *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* mRNA oraz immunofluorescencyjne barwienie białka FMRP w dendrytach szczurzych neuronów hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli.

Rycina 28. Fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja z użyciem sensownych (kontrolnych) sond dla *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* mRNA oraz immunofluorescencyjne barwienie białka FMRP w dendrytach szczurzych neuronów hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli.

Rycina 29. Schemat stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach stosowanej w celu wywołania aktywacji synaptycznej.

Rycina 30. Analiza poziomu zależnej od aktywności synaptycznej fosforylacji białek ERK1 i ERK2 w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 31. Schemat prezentujący lokalną syntezę, kierowanie na błonę postsynaptyczną i cięcie proteolityczne białka NLGN1 w odpowiedzi na aktywację synaptyczną.

Rycina 32. Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN1 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot.

Rycina 33. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne poziomu zewnątrzkomórkowych sieciowanych dimerów NLGN1 (zNLGN1) i wewnątrzkomórkowych monomerów NLGN1 (wNLGN1) w 19 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych z myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 34. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN1 metodą Western blot.

Rycina 35. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN1 (zNLGN1) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po biotynylacji białek powierzchniowych.

Rycina 36. Analiza masy molekularnej zewnątrzkomórkowych NLGN1, NLGN2, NLGN3 (zNLGN) i wewnątrzkomórkowych NLGN1, NLGN2, NLGN3 (wNLGN) metodą Western blot po deglikozylacji sieciowanych białek z użyciem enzymów N-glikozydazy F (PNGazy F) i endoglikozydazy H (Endo H).

Rycina 37. Schemat prezentujący lokalną syntezę, kierowanie na błonę postsynaptyczną i przypuszczalne cięcie proteolityczne białka NLGN3 w odpowiedzi na aktywność synaptyczną.

Rycina 38. Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot.

Rycina 39. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne poziomu zewnątrzkomórkowych sieciowanych dimerów NLGN3 (zNLGN3) i wewnątrzkomórkowych monomerów NLGN3 (wNLGN3) w 19 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych z myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 40. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN3 metodą Western blot.

Rycina 41. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN3 (zNLGN3) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po biotynylacji białek powierzchniowych.

Rycina 42. Schemat sieciowania dimerów NLGN2 oraz stymulacji receptorów NMDA prowadzącej do lokalnej syntezy białka NLGN2 i kierowania NLGN2 na błonę postsynaptyczną.

Rycina 43. Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN2 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot.

Rycina 44. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN2 metodą Western blot.

Rycina 45. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN2 (zNLGN2) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po biotynylacji białek powierzchniowych.

Rycina 46. Analiza Western blot prezentująca zależny od aktywności synaptycznej poziom cięcia proteolitycznego NLGN1, NLGN2, NLGN3 w synaptoneurosomach

myszy WT i *Fmr1* KO w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min po stymulacji receptorów NMDA.

Rycina 47. Analiza Western blot mająca na celu weryfikację specyficzności prążków reprezentujących odcięty C-końcowy fragment NLGN3 (cNLGN3 CTF) z użyciem synaptoneurosomów WT i *Nlgn3* KO w czasie 2,5 minut po aktywacji synaptycznej.

Rycina 48. Przyrównanie sekwencji domen kotwiczących NLGN1, NLGN2 i NLGN3 za pomocą serwera Clustal Omega.

Rycina 49. Analiza Western blot poziomu NLGN3 o pełnej długości (NLGN3 FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3 (cNLGN3 CTF) w synaptoneurosomach myszy WT w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2,5') oraz 10 minut po aktywacji synaptycznej (10') poprzedzonej inkubacją z inhibitorami proteaz MMP-9/13i i GM6001.

Rycina 50. Analiza Western blot poziomu białka neuroigin pełnej długości (NLGN FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu (cNLGN CTF) dla NLGN1, NLGN2, NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2,5') oraz 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej poprzedzonej 10 minutową inkubacją synaptoneurosomów z inhibitorem proteaz MMP-9/13i w stężeniu 5 μ M.

Rycina 51. Analiza Western blot prezentująca zależny od aktywności synaptycznej poziom cięcia proteolitycznego NLGN1, NLGN2, NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT i *Mmp-9* KO w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min po stymulacji receptorów NMDA.

Rycina 52. Analiza Western blot poziomu NLGN3 o pełnej długości (NLGN3 FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3 (cNLGN3 CTF) w synaptoneurosomach myszy *Mmp-9* KO w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2,5') oraz 10 minut po aktywacji synaptycznej (10') poprzedzonej inkubacją z inhibitorami proteaz MMP-9/13i i GM6001.

Rycina 53. Schemat przedstawiający zależną od aktywności dystrybucję NLGN1 i NLGN3 w synapsach glutaminergicznych myszy WT i *Fmr1* KO.

Rycina 54. Białko FMRP reguluje lokalną translację mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zależną od aktywności synaptycznej.

Rycina 55. Indukowana aktywnością synaptyczną translacja mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zachodzi lokalnie w synapsie.

Spis tabel

Tabela 1. Autyzm syndromiczny – choroby współwystępujące z ASD oraz ich wybrane cechy kliniczne.

Tabela 2. Klasyfikacja genów neuroligin i neureksyn na podstawie siły korelacji z występowaniem ASD u ludzi według baz danych SFARI i AutismKb.

Tabela 3. Nazwy i funkcje wybranych genów, w których zmiany genetyczne korelują z wystąpieniem ASD.

Tabela 4. Sekwencja nukleotydowa starterów użytych do genotypowania myszy.

Tabela 5. Program reakcji odwrotnej transkrypcji w termocyklerze Bio-rad.

Tabela 6. Nazwy komercyjnie dostępnych sond TaqMan użytych do reakcji qRT-PCR w rozprawie doktorskiej.

Tabela 7. Program reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w termocyklerze Roche.

Tabela 8. Sekwencje nukleotydowe starterów użytych do stworzenia antysensownych i sensownych sond oligonukleotydowych do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

Tabela 9. Lista użytych do doświadczeń przeciwciał pierwszorzędowych wraz z ich rozcieńczeniem, numerem katalogowym i nazwą producenta.

Tabela 10. Liczba sekwencji bogatych w guaninę tworzących strukturę G-kwartetu w szczurzych transkryptach *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* zidentyfikowanych za pomocą programu QGRS Mapper.

Tabela 11. Przypuszczalne miejsca cięcia mysiej sekwencji aminokwasowej NLGN1, NLGN2 i NLGN3 przez enzym MMP-9 w obrębie domeny kotwiczącej, w której potwierdzono miejsce cięcia NLGN1 przez enzym MMP-9 zidentyfikowane przez serwer PROPSERous.

Wykaz stosowanych skrótów

aa	Sekwencja aminokwasowa (<i>ang. aminoacid sequence</i>)
AChE	Domena homologiczna do acetylocholinesterazy (<i>ang. acetylcholinesterase-homology domain</i>)
ADAM10	Białko zawierające domenę dezyntegryny i metaloproteiny 10 (<i>ang. A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>)
ADHD	Zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (<i>ang. attention deficit hyperactivity disorder</i>)
AMPA	Kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (<i>ang. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
AMPA	Receptor kwasu glutaminowego i AMPA, kanał jonowy (<i>ang. AMPA receptor</i>)
ANOVA	Analiza wariancji (<i>ang. analysis of variance</i>)
APS	Nadsiarczan amonu (<i>ang. ammonium persulfate</i>)
APV	Kwas DL-2-amino-5-fosfonowalerianowy (<i>ang. (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid</i>)
ASD	Zaburzenia ze spektrum autyzmu (<i>ang. autism spectrum disorder</i>)
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan (<i>ang. adenosine triphosphate</i>)
BCA	Kwas bicinchonowy (<i>ang. bicinchonic acid</i>)
CAM	Białko adhezji komórkowej (<i>ang. cell adhesion molecule</i>)
CaMKII	Kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny typu II (<i>ang. calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CASK	Białkowa kinaza serynowa zależna od wapnia i kalmoduliny z rodziny MAGUK (<i>ang. calcium/calmodulin dependent serine protein kinase</i>)
cDNA	Komplementarny DNA uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji RNA (<i>ang. complementary DNA</i>)
CNV	Polimorfizm liczby kopii DNA (<i>ang. copy number variation</i>)
COS	Linia komórek podobnych do fibroblastów z małpiej tkanki nerkowej (<i>ang. cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying SV40 genetic material</i>)
D396X	Mutacja wprowadzająca kodon STOP na miejsce kwasu asparaginowego w pozycji 396 sekwencji aminokwasowej
DIV	Dzień hodowli <i>in vitro</i> (<i>ang. day in vitro</i>)

DMSO	Dimetylosulfotlenek (<i>ang. dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoksyrybonukleotyd (<i>ang. deoxyribonucleotide</i>)
DSM-5	Kryteria diagnostyczne zaburzeń psychicznych (<i>ang. diagnostic and statistical manual of mental disorders – version 5</i>)
DTT	Ditiotreitol (<i>ang. dithiothreitol</i>)
ECM	Macierz zewnątrzkomórkowa (<i>ang. extracellular matrix</i>)
EDTA	Kwas etylenodiaminotetraoctowy (<i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEG	Elektroencefalografia (<i>ang. electroencephalography</i>)
EGF	Naskórkowy czynnik wzrostu (<i>ang. epidermal growth factor</i>)
eIF4E	Eukariotyczny czynnik inicjacji 4E (<i>ang. eukaryotic initiation factor 4E</i>)
ELFN	Białko zawierające zewnątrzkomórkowe powtórzenia bogate w leucynę i fibronektynę (<i>ang. extracellular leucine-rich repeat fibronectin containing</i>)
EPSC	Pobudzające prądy postsynaptyczne (<i>ang. excitatory postsynaptic currents</i>)
ERK	Kinazy MAP regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe (<i>ang. extracellular signal-regulated kinases</i>)
FXS	Zespół łamliwego chromosomu X (<i>ang. fragile X syndrome</i>)
FXTAS	Zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (<i>ang. fragile X-associated tremor/ataxia syndrome</i>)
<i>Fmr1</i>	Gen kodujący białko zespołu łamliwego chromosomu X (<i>ang. fragile X mental retardation 1</i>)
<i>Fmr1</i> KO	Myszy pozbawione ekspresji genu <i>fmr1</i> (<i>ang. fmr1 gene knock-out</i>)
FMRP	Białko zespołu łamliwego chromosomu X (<i>ang. fragile X mental retardation protein</i>)
FPKM	Zsekwencjonowane fragmenty na kilobazę sekwencji transkryptu na milion zmapowanych fragmentów (<i>ang. fragments per kilobase of transcript sequence per million mapped fragments</i>)
GABA	Kwas gamma-aminomasłowy (<i>ang. gamma-aminobutyric acid</i>)
GUK	Kinaza guanylanowa (<i>ang. guanylate kinase</i>)
GSK-3	Kinaza syntazy glikogenu 3 (<i>ang. glycogen synthase kinase 3</i>)
H	Godzina (<i>ang. hour</i>)
HBSS	Zbilansowany roztwór soli Hanka (<i>ang. Hank's balanced salt solution</i>)

HEK293	Linia embrionalnych komórek ludzkiej nerki (<i>ang. human embryonic kidney 293 cells</i>)
HITS-CLIP	Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie po immunoprecypitacji i sieciowaniu za pomocą światła ultrafioletowego (<i>ang. high-throughput sequencing of cross-linking immunoprecipitation</i>)
hnRNP	Heterogenne rybonukleoproteiny jądrowe (<i>ang. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>)
ICD-11	Międzynarodowa klasyfikacja chorób (<i>ang. international classification of diseases – version 11</i>)
IP	Próbki RNA współwytrącane z przeciwciałem (<i>ang. immunoprecipitate</i>)
kDa	Kilodalton, jednostka masy atomowej, tysiąc daltonów (<i>ang. kilodalton</i>)
KH	Domena homologii K (<i>ang. K homology domain</i>)
KI	Model zwierzęcy z wprowadzoną mutacją wybranego genu (<i>ang. knock-in</i>)
KO	Model zwierzęcy pozbawiony ekspresji wybranego genu (<i>ang. knock-out</i>)
KO	Domena składająca się z lamininy, neureksyny, globuliny wiążącej hormon płci
LNS	(<i>ang. laminin, neurexin, sex hormone-binding globulin</i>)
LRRTM	Neuronalne białko transbłonowe bogate w powtórzenia leucyny (<i>ang. leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein</i>)
LTD	Długotrwałe osłabienie synaptyczne (<i>ang. long-term depression</i>)
LTP	Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (<i>ang. long-term potentiation</i>)
LTP	Białko kotwiczące zawierające domenę MAM (<i>ang. MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchors</i>)
MDGA	Metabotropowy receptor dla glutaminianu (<i>ang. metabotropic glutamate receptor</i>)
mGluR	Minuta (<i>ang. minute</i>)
Min	Miniaturowe hamujące prądy synaptyczne (<i>ang. miniature inhibitory postsynaptic currents</i>)
mIPSC	
MMP	Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (<i>ang. matrix Metalloproteinase</i>)
MMP	Matrycowy RNA (<i>ang. messenger RNA</i>)
mRNA	Sygnal eksportu jądrowego (<i>ang. nuclear export signal</i>)
NES	Lignady G netryny (<i>ang. netrin-G ligands</i>)

NGL	Surowica krwi kozy (<i>ang. normal goat serum</i>)
NGS	Neuroligina (<i>ang. neuroligin</i>)
NLGN	Sygnal lokalizacji jądrowej (<i>ang. nuclear localization signal</i>)
NLS	Kwas N-metylo-D-asparaginowy (<i>ang. N-methyl-D-aspartate acid</i>)
NMDA	Receptor kwasu glutaminowego, kanał jonowy (<i>ang. NMDA receptor</i>)
NMDAR	Neureksyna (<i>ang. neurexin</i>)
NRXN	Wynik nieistotny statystycznie (<i>ang. not statistically significant</i>)
ns	Komórka prekursorowa oligodendrocytu (<i>ang. oligodendrocyte precursor cell</i>)
OPC	Osesek w dniu urodzenia (<i>ang. postnatal day 0</i>)
P0	Roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PBS	Łączuchowa reakcja polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
PCR	Domena wiążąca białka zawierające motyw PDZ (<i>ang. post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (Zo-1)</i>)
PDZ	Paraformaldehyd (<i>ang. paraformaldehyde</i>)
PFA	Białko gęstości postsynaptycznej 95 (<i>ang. postsynaptic density protein-95</i>)
PSD-95	Liczba par zasad (<i>ang. base pair</i>)
pz	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (<i>ang. quantitative real time PCR</i>)
qRT-PCR	Mutacja skutkująca zmianą aminokwasu z argininy na cysteinę w pozycji 451
R451C	Mutacja skutkująca zmianą aminokwasu z argininy na cysteinę w pozycji 704
R704C	Względne przyspieszenie odśrodkowe równoważne przeciążeniu liczonym jako wielokrotność przyspieszenia ziemskiego g (<i>ang. relative centrifugal force</i>)
Rcf	Domena białka wiążąca sekwencję RNA tworzącą G-kwartet składająca się z powtórzeń argininy i glicyny (<i>ang. arginine, glycine, glycine</i>)
RGG box	Kwas rybonukleinowy (<i>ang. ribonucleic acid</i>)
RNA	Granula rybonukleoproteinowa (<i>ang. ribonucleoprotein particle</i>)
RNP	Temperatura pokojowa (<i>ang. room temperature</i>)
RT	Sekunda (<i>ang. second</i>)
Sek.	Średni błąd średniej arytmetycznej (<i>ang. standard error of the mean</i>)
SEM	Dodecylosiarczan sodu, detergent jonowy (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

SDS-	(ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAGE	Domena homologii 3 SRC (ang. <i>SRC homology 3 domain</i>)
SH3	Krótkie cząsteczki RNA o drugorzędowej strukturze szpilki do włosów (ang. <i>short hairpin RNA</i>)
shRNA	Miejsce alteratywnego składania (ang. <i>alternative splicing site</i>)
ss	Bufor soli fizjologicznej z cytrynianem sodu (ang. <i>saline-sodium citrate buffer</i>)
SSC	Enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworu α (ang. <i>tumor necrosis factor α-converting enzyme</i>)
TACE	Transbłonowe białka regulatorowe receptorów AMPA (ang. <i>transmembrane AMPAR regulatory protein</i>)
TARP	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina (ang. <i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)
TEMED	Domena transbłonowa (ang. <i>transmembrane domain</i>)
	Trihydroksyaminometan (ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
TM	Obszar mRNA nieulegający translacji (ang. <i>untranslated region</i>)
TRIS	Myszy o genotypie dzikim (ang. <i>wild type</i>)
UTR	
WT	

Streszczenie w języku polskim

Synapsy są wysoce wyspecjalizowanymi miejscami interakcji pomiędzy dwiema komórkami nerwowymi. Prawidłowe połączenie synaptyczne jest możliwe dzięki występowaniu po stronie pre- i postsynaptycznej białek adhezyjnych. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa interakcja postsynaptycznych neuroligin z presynaptycznymi neureksynami. Badania ostatnich lat wskazują na istotny udział neuroligin nie tylko w utrzymaniu fizycznego pomostu zapewniającego stabilność synapsy, ale przede wszystkim w regulacji prawidłowego przewodnictwa synaptycznego.

Zaburzenia w regulacji poziomu białek synaptycznych mogą prowadzić do dysfunkcji synaps. Wykazano, że mutacje w genach neuroligin korelują z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu. Badania na poziomie molekularnym wykazały, że odkryte mutacje zaburzają synaptyczną lokalizację neuroligin oraz skutkują nieprawidłowościami w przekazywaniu sygnału. Niedawno zasugerowano, że proces cięcia proteolitycznego może być czynnikiem regulującym poziom neuroligin na synapsie. Wykazano, że NLGN1 ulega cięciu przez dwie proteazy synaptyczne: MMP-9 oraz ADAM-10. Ponadto, dowiedziono, że przecięty fragment NLGN3 jest mitogenem stymulującym wzrost nowotworów mózgu. Niemniej jednak dokładny mechanizm obróbki proteolitycznej neuroligin pozostawał nieznany, tak samo jak proteazy uczestniczące w procesie cięcia innych izoform neuroligin.

Zespół łamliwego chromosomu X (FXS) jest chorobą monogenową zaliczaną do syndromicznych zaburzeń ze spektrum autyzmu oraz drugą po zespole Downa przyczyną niepełnosprawności intelektualnej na świecie. Bezpośrednią przyczyną choroby jest dynamiczna mutacja w genie *fmr1*, która powoduje brak ekspresji białka zespołu łamliwego chromosomu X (FMRP). FMRP jest białkiem wiążącym RNA ulegającym silnej ekspresji w neuronach, którego podstawową funkcją jest hamowanie synaptycznej translacji mRNA. Brak regulacji translacji przez białko FMRP prowadzi do nieprawidłowej ekspresji wielu ważnych synaptycznych białek kluczowych dla funkcjonowania neuronów, prawidłowego przekazywania synaptycznego i plastyczności synaptycznej. Pomimo wielu lat badań nad podłożem zespołu łamliwego chromosomu X wciąż nie został poznany mechanizm zmian zachodzących na poziomie komórkowym pozwalający na zaproponowanie odpowiedniej strategii terapeutycznej i efektywnego leczenia.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie molekularnych mechanizmów regulujących poziom neurologin – genów związanych zarówno z autyzmem jak i nowotworami – w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X.

Pierwszym celem badań była ocena poziomu ekspresji neurologin (mRNA oraz białka) w synaptoneurosomach myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO. Ocenę poziomu białka neurologin przeprowadzono również w pierwotnych hodowlach komórek neuronalnych hipokampa. Udowodniono, że poziom białka NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w synapsie myszy *Fmr1* KO, podczas gdy poziom mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* nie różni się pomiędzy genotypami myszy WT i *Fmr1* KO. To zadanie było kluczowe, gdyż pozwoliło sformułować tezę, że podwyższony poziom neurologin jest wynikiem zwiększonej translacji synaptycznej tych białek u myszy *Fmr1* KO. Kolejnym celem było zbadanie interakcji białka FMRP z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3*. Za pomocą metody współwytrącania RNA oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazano, że białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* w neuronach. Następnie, używając metody chemicznego sieciowania białek powierzchniowych przeprowadzono charakterystykę zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji neurologiny 1, 2 oraz 3 w części wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej synapsy. Te badania wykazały, że brak białka FMRP w zespole łamliwego chromosomu X prowadzi do zwiększonej inkorporacji neurologiny 1 oraz 3 do błony postsynaptycznej. Ponadto, dowiedziono, iż wszystkie izoformy neurologin – NLGN1, NLGN2, NLGN3 ulegają cięciu proteolitycznemu na synapsie w warunkach fizjologicznych. Proces obróbki proteolitycznej neurologin jest zależny od aktywacji synaptycznej i następuje już w ciągu 2,5 minut po pobudzeniu neuronalnym. Co więcej, wykazano, że cięcie proteolityczne białek neurologin występuje też u myszy *Fmr1* KO, co sugeruje, że ten proces nie jest zaburzony w zespole łamliwego chromosomu X. W końcowym etapie badań podjęto próbę dokładniejszego wyjaśnienia tego mechanizmu regulującego poziom neurologin w synapsie. W tym celu przeprowadzono wstępną identyfikację proteaz odpowiedzialnych za cięcie neurologin w synaptoneurosomach. Wyniki tych eksperymentów wskazują na udział proteazy MMP-13 w obróbce proteolitycznej białek neurologin.

Podsumowując, wyniki zgromadzone w tej pracy doktorskiej wskazują, że poziom ekspresji neurologin na synapsie jest zależny od dwóch czynników: kontroli translacji

mRNA neuroligin przez białko FMRP oraz regulacji przez proces cięcia proteolitycznego białek neuroligin. Powyższe wyniki poszerzają wiedzę na temat funkcji synapsy w warunkach fizjologicznych na poziomie molekularnym. Ponadto, prezentują mechanizm, za pomocą którego brak białka FMRP może przyczyniać się do nieprawidłowego poziomu białek związanych z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Co więcej, uzyskane dane mogą wskazać ścieżki do opracowania nowych strategii terapeutycznych w przyszłości.

Streszczenie w języku angielskim

Synapses are highly specialized sites of interaction between two nerve cells. Proper synaptic connection is possible due to the presence of cell adhesion proteins on the pre- and postsynaptic side. The interaction of postsynaptic neuroligins with presynaptic neurexins plays a key role in this process. Studies in recent years indicate a significant role of neuroligins not only in maintaining the physical bridge that ensures the stability of the synapse, but above all in the regulation of proper synaptic transmission.

Disturbances in the regulation of synaptic protein level can lead to synaptic dysfunction. It has been revealed that mutations in neuroligin genes correlate with the occurrence of autism spectrum disorders. Further research at the molecular level has shown that the discovered mutations disrupt the synaptic localization of neuroligins and result in impaired signal transduction. It has recently been suggested that the proteolytic cleavage process may be a factor regulating the level of neuroligins at the synapse. NLGN1 has been shown to be cleaved by two synaptic proteases: MMP-9 and ADAM-10. Moreover, the cleaved NLGN3 fragment proved to be a mitogen stimulating the growth of brain tumors. Nevertheless, the exact mechanism of the proteolytic shedding of neuroligins remained unknown, as did the proteases involved in cleaving other isoforms of neuroligins.

Fragile X syndrome (FXS) is a monogenic disease classified as syndromic autism spectrum disorder and the second cause of intellectual disability in the world after Down's syndrome. The direct cause of the disease is a dynamic mutation in the *fmr1* gene that results in the lack of the fragile X mental retardation protein (FMRP) expression. FMRP is an RNA-binding protein highly expressed in neurons. FMRP's primary function is to inhibit synaptic translation of mRNA. The failure to regulate translation by FMRP leads to the impaired expression of many important synaptic proteins essential to neuronal function, proper synaptic transmission and plasticity. Despite many years of research on the basis of the fragile X syndrome, the mechanism of changes taking place at the cellular level has not yet been fully understood, not allowing for the implementation of an appropriate therapeutic strategy and effective treatment.

The main goal of this research was to investigate the molecular mechanisms regulating the level of neuroligins – genes associated with both autism and cancer – in the synapse under physiological conditions and in the fragile X syndrome.

The first aim of the study was to assess the level of neuroligins expression (mRNA and protein) in the synaptoneurosomes isolated from wild type and *Fmr1* KO mice. Assessment of neuroligins protein level was also performed in primary cultures of hippocampal neuronal cells. It has been proved that the level of NLGN1 and NLGN3 protein is increased in the synapse of *Fmr1* KO mice, while the level of *Nlgn1*, *Nlgn2* and *Nlgn3* mRNA does not differ between the genotypes of wild type and *Fmr1* KO mice. This task was crucial as it led to the research hypothesis that the increased level of neuroligins was the result of increased synaptic translation of these proteins in synapses of the *Fmr1* KO mice. Another goal was to study the interaction of FMRP with *Nlgn1*, *Nlgn2* and *Nlgn3* mRNA. Using RNA co-immunoprecipitation and fluorescent *in situ* hybridization methods, it was confirmed that FMRP interacts with *Nlgn1*, *Nlgn2* and *Nlgn3* mRNAs in neurons. Then, using the method of chemical *in situ* crosslinking of surface proteins, the characterization of the activity-dependent synaptic distribution of neuroligin 1, 2 and 3 in the intracellular part and at the surface of postsynaptic membrane of the synapse was performed. These studies showed that the lack of FMRP in the fragile X syndrome leads to increased incorporation of neuroligin 1 and 3 into the postsynaptic membrane. Moreover, it has been proved that all neuroligin isoforms - NLGN1, NLGN2, NLGN3 undergo proteolytic cleavage at the synapse under physiological conditions. The process of proteolytic processing of neuroligins depends on synaptic activity and occurs as early as 2.5 minutes after neuronal stimulation. Moreover, it has been shown that proteolytic cleavage of neuroligin proteins also occurs at synapses of *Fmr1* KO mice, what suggests that this process is not fully impaired in the fragile X syndrome. At the final stage of the research, an attempt was made to explain this mechanism regulating the level of neuroligins in the synapse in more detail. For this purpose, the preliminary identification of proteases responsible for cleavage of neuroligins in synaptoneurosomes was performed. The results of these experiments indicate the role of the MMP-13 protease in the proteolytic shedding of the neuroligin proteins.

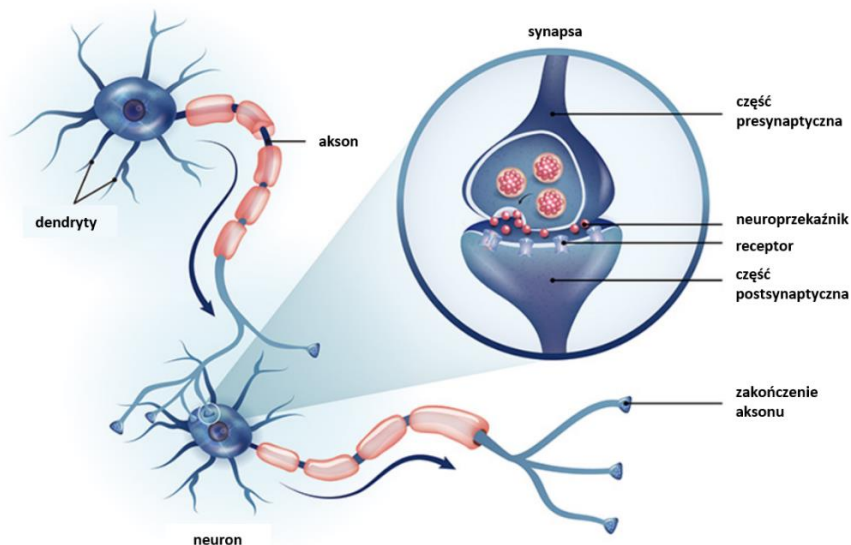
In summary, the results gathered in this dissertation indicate that the expression level of neuroligins in the synapse depends on two factors: the control of neuroligin mRNA

translation by the FMRP and regulation by the proteolytic cleavage of neuroligin proteins. The presented results broaden our understanding of synapse function under physiological conditions at the molecular level. Moreover, they present the mechanism by which the lack of FMRP may contribute to abnormal levels of proteins associated with autism spectrum disorders. Moreover, the obtained data may indicate pathways for the development of new therapeutic strategies in the future.

1. Wstęp

1.1. Komórka nerwowa i synapsa

Komórki nerwowe znacznie różnią się od innych komórek w organizmie. Neuron składa się z ciała komórki (zwanego również perikarionem lub somą) z jądrem komórkowym oraz wypustek: aksonu i dendrytów (Rycina 1). Akson jest rozgałęzioną wypustką, która może sięgać długości nawet kilku metrów, dzięki czemu zapewnia kontakt z inną komórką (nerwową, mięśniową lub gruczołową) (Azarfar et al. 2018). Dendryty tworzą mniej lub bardziej rozbudowane drzewo dendrytyczne. Pomiedzy dendrytem i aksonem tworzą się synapsy, będące wysoce wyspecjalizowanymi miejscami styku pomiędzy dwiema komórkami nerwowymi. Część postsynaptyczna należy do dendrytu, a część presynaptyczna zawierająca neuroprzekaźniki należy do aksonu. W zależności od obecności charakterystycznych białek w części postsynaptycznej synapsy są klasyfikowane na pobudzające (glutaminergiczne) i hamujące (GABAergiczne). Synapsy pobudzające zawierają białko gęstości postsynaptycznej (ang. postsynaptic density protein 95, PSD-95), a w synapsach hamujących część postsynaptyczna zawiera białko strukturalne gefrynę (ang. gephyrin) (Choquet and Triller 2013). Wzajemny fizyczny kontakt komórek nerwowych odbywa się poprzez szczelinę synaptyczną. Połączenie części pre- i postsynaptycznej jest możliwe dzięki obecności białek adhezyjnych, do których należą postsynaptyczne neuroliginy i ich presynaptyczny partner neureksyny (Schreiner et al. 2017).



Rycina 1. Schemat komórki nerwowej i synapsy.

1.2. Biologia przekazywania impulsu nerwowego

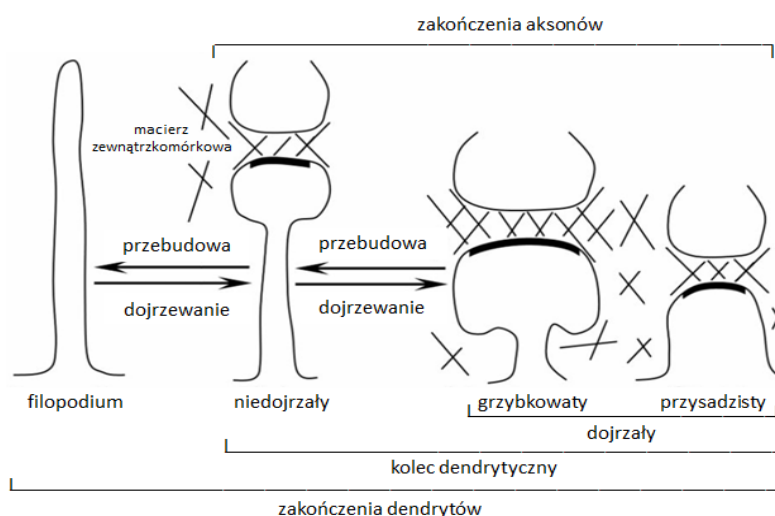
Nadrzędną funkcją komórek nerwowych jest przekazywanie oraz przetwarzanie informacji w postaci sygnałów elektrycznych - impulsów nerwowych, które są krótkotrwałymi zmianami potencjału błony komórkowej neuronu. W stanie niepobudzonym neuron posiada tzw. „potencjał spoczynkowy”. W synapsie chemicznej w wyniku pobudzenia neuronalnego przez odpowiednio silny bodziec dochodzi do uwolnienia neuroprzekaźników z zakończenia aksonu do szczeliny synaptycznej i powstania potencjału czynnościowego. Wyróżniamy neuroprzekaźniki pobudzające i hamujące, których działanie jest przeciwstawne (Sheng 2003).

Uwolnienie neuroprzekaźników pobudzających (np. acetylocholiny, glutaminianu, asparaginianu, noradrenaliny, adrenaliny, dopaminy, histaminy czy somatostatyny) prowadzi do ich wychwytu przez receptory w błonie postsynaptycznej, depolaryzacji błony postsynaptycznej (pobudzenia) i w konsekwencji do przekazania impulsu nerwowego z komórki do komórki. Z kolei, gdy uwolnione zostaną neuroprzekaźniki hamujące, takie jak np. kwas γ -aminomasłowy (kwas GABA), glicyna, alanina czy peptyd enkefalina skutkuje to hiperpolaryzacją błony postsynaptycznej, czyli obniżeniem potencjału komórki nerwowej i zmniejszeniem zdolności tego neuronu do przekazywania impulsów. Wśród najważniejszych receptorów, z którymi oddziałują neuroprzekaźniki po stronie postsynaptycznej wymienia się receptory dla glutaminianu: jonotropowe *N*-metylo-*D*-asparaginowe (NMDA) i α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowe (AMPA), kainianowe (KARs), metabotropowe receptory dla glutaminianu (mGluR₁₋₈) oraz receptory GABAergiczne (GABA_A, GABA_B, GABA_C). Przekazanie sygnału nerwowego nie byłoby możliwe gdyby nie bliskość obu zakończeń nerwowych warunkowana obecnością białek adhezyjnych na synapsie (Sheng 2003).

1.3. Plastyczność strukturalna i plastyczność synaptyczna

Synapsy pobudzające osadzone są na zakończeniach dendrytów – na niewielkich, ale wysoce wyspecjalizowanych wypustkach zwanych kolcami dendrytycznymi (Bagni et al. 2012). Jak pokazano na rycinie 2, kolce dendrytyczne mogą przybierać różne kształty w zależności od stopnia dojrzałości (plastyczność rozwojowa). Umowny podział wyróżnia: podłużne filopodia (ang. filopodium), kolce niedojrzałe (ang. thin spines), kolce grzybkowate (ang. mushroom spines), kolce przysadziste (ang. stubby spines) oraz

kolce rozgałęzione (ang. branched spines) (Hering and Sheng 2001). Wydłużone i cienkie kolce dendrytyczne są niedojrzałe i nie tworzą synapsy. Podczas procesu dojrzewania następuje zmiana ich kształtu na grzybkowaty lub przysadzisty, co odbywa się przez skrócenie nóżki i powiększenie średnicy główki (Dansie and Ethell 2011). Synapsa na każdym dojrzałym kolcu dendrytycznym funkcjonuje jako autonomiczna struktura, zdolna do przekazywania sygnałów w zależności od aktywacji synaptycznej, ale niezależnie od synaps zlokalizowanych na innych kolcach. Od liczby oraz siły wytworzonych w ten sposób połączeń synaptycznych zależą m.in. procesy uczenia się i przechowywania informacji w postaci pamięci (Dansie and Ethell 2011).



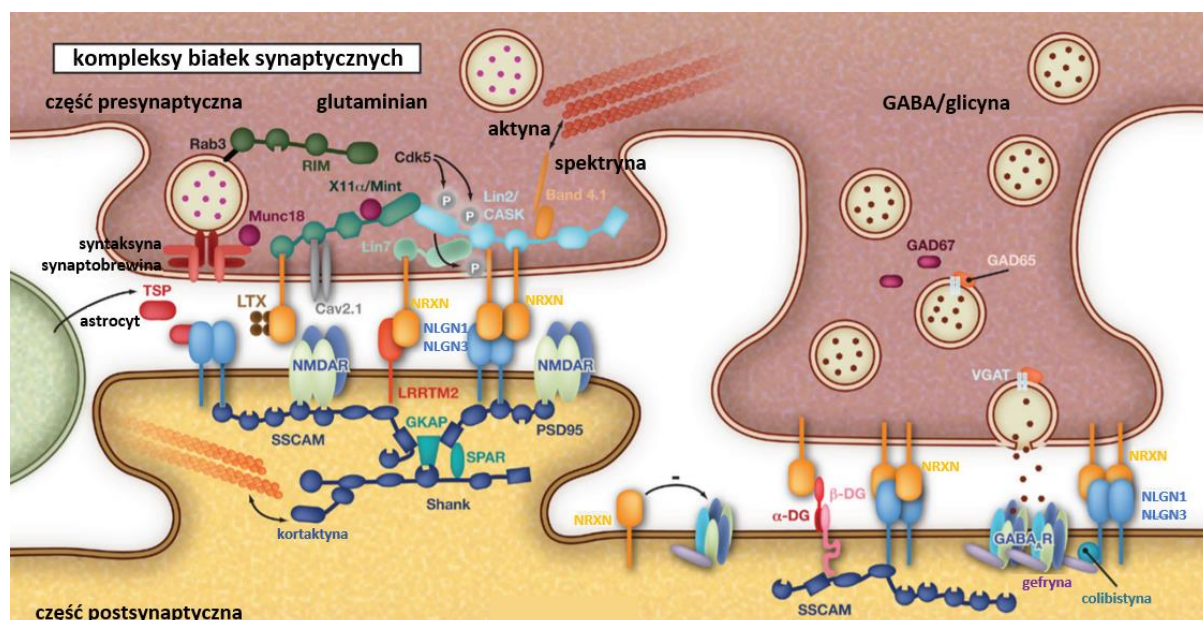
Rycina 2. Rodzaje kolców dendrytycznych i schemat ich dojrzewania oraz przebudowy. Zmodyfikowano z (Dansie and Ethell 2011).

Zdolność neuronów do tworzenia nowych połączeń oraz reorganizacji i adaptacji siły synaps już istniejących określamy mianem plastyczności synaptycznej, a w szerszym kontekście plastycznością strukturalną mózgu. Co istotne, proces ten zachodzi również w dojrzałym mózgu stanowiąc podstawę uczenia się oraz tworzenia pamięci długotrwałej nawet w późnych latach życia. Plastyczność synaptyczna jest opisywana jako długotrwałe wzmocnienie lub osłabienie siły połączeń między neuronami, które zachodzi w wyniku aktywności synaptycznej jako skutek szeregu molekularnych i morfologicznych zmian. Kluczowym aspektem plastyczności synaptycznej jest lokalna synteza nowych białek w synapsie. Wśród nich wyróżniamy białka uczestniczące w transporcie mRNA i innych białek, w kaskadach sygnałowych jak np. kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny (CAMKII α) i kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK-3) oraz białka modyfikujące zdolność receptorów NMDA, AMPA, mGluR do przekazywania sygnału. Obecnie

wiadomo, że bezpośredni wpływ na zmianę kształtu kolców mają białka takie jak PSD-95, ale też komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (Włodarczyk et al. 2011), pozostające w stałym i ścisłym kontakcie z powierzchnią synaps, jak również liczba i siła oddziaływania białek adhezyjnych na synapsie (Jang, Lee, and Kim 2017).

1.4. Białka adhezyjne na synapsie

Prawidłowe połączenie synaptyczne jest możliwe dzięki występowaniu po stronie pre- i postsynaptycznej białek adhezyjnych łączących ze sobą dwie strony synapsy. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa interakcja neuroligin z neureksynami (Jang, Lee, and Kim 2017). Do innych znanych białek adhezyjnych (ang. cell adhesion molecules, CAMs) należą: N-kadheryny, dystroglikan, LRRTMs (leucine-rich repeat transmembrane neuronal proteins), MDGAs (MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchors), IgSF11 (immunoglobulin superfamily member 11), SALM1 (synaptic adhesion-like molecule), NGLs (netrin-G ligands), synCAM (synaptic cell adhesion molecule), Efn1 (extracellular leucine-rich repeat fibronectin containing 1) i teneuryny (Rudenko 2017). Złożoność synapsy pobudzającej oraz hamującej wraz z przykładowymi białkami adhezyjnymi i receptorami przedstawiono na rycinie 3.



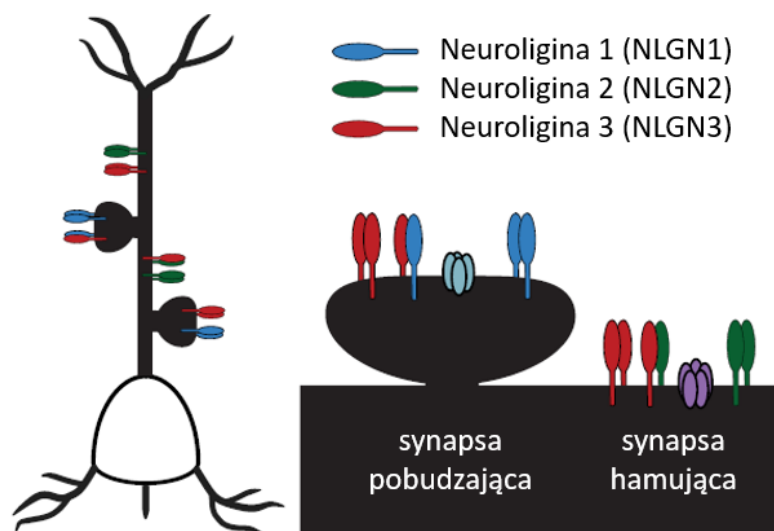
Rycina 3. Schemat synapsy prezentujący złożoność synapsy pobudzającej (po lewej) i hamującej (po prawej) wraz z niektórymi białkami adhezyjnymi oraz receptorami. Na podstawie (Baudouin and Scheiffele 2010).

1.5. Charakterystyka białek neuroligin

1.5.1. Synaptyczna specyfikacja neuroligin

Neuroliginy (NLGN) są białkami adhezji komórkowej zlokalizowanymi w błonie postsynaptycznej synapsy (Sudhof 2008). Neuroliginy zostały po raz pierwszy opisane jako białka oddziałujące z β -neureksynami – białkami zlokalizowanymi po stronie presynaptycznej (Ichtchenko et al. 1995). Odkrywcą tych białek jest Thomas C. Südhof, obecnie profesor na Uniwersytecie Stanforda, który otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2013 roku za odkrycia dotyczące maszynerii regulującej transport pęcherzykowy. U myszy neuroliginy są kodowane przez cztery geny: *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*, *Nlgn4* (Ichtchenko, Nguyen, and Sudhof 1996; Sudhof 2008). U ludzi występuje dodatkowo gen *Nlgn4Y*. Trzy homologiczne izoformy NLGN1, NLGN2 i NLGN3 ulegają ekspresji na wysokim poziomie w mózgu gryzoni i są silnie zachowane w ewolucji (Ichtchenko, Nguyen, and Sudhof 1996). Z kolei poziom ekspresji NLGN4 w mózgu myszy jest znacznie niższy i jest ona mniej zachowana w ewolucji, co uniemożliwia ekstrapolację wyników uzyskanych na mysich modelach NLGN4 na ludzkie neurony (Bolliger et al. 2008; Marro et al. 2019). Pomimo możliwości współwystępowania neuroligin w tym samym neuronie, poszczególne izoformy neuroligin pełnią specyficzne funkcje w zależności od typu synapsy, na powierzchni której ulegają ekspresji (Chanda et al. 2017).

Jak pokazano na rycinie 4, NLGN1 jest obecna na synapsach pobudzających (Song et al. 1999; Chubykin et al. 2007), NLGN2 i NLGN4 na synapsach hamujących (Varoqueaux, Jamain, and Brose 2004; Chubykin et al. 2007; Pouloupoulos et al. 2009; Hammer et al. 2015; Hoon et al. 2011), podczas gdy NLGN3 występuje na obu typach synaps w centralnym układzie nerwowym (Budreck and Scheiffele 2007; Pouloupoulos et al. 2012). Dowiedziono, że te trzy izoformy neuroligin ulegają ekspresji w wielu rejonach ludzkiego mózgu (<http://human.brain-map.org/>) oraz mysiego (<http://mouse.brain-map.org/>) jak na przykład: hipokamp, kora mózgowa, wzgórze, prążkowie i mózdzek (Jones, Overly, and Sunkin 2009). U myszy NLGN4 zlokalizowana jest na synapsach glicynergicznym wzgórza, pnia mózgu, rdzenia kręgowego i siatkówki (Hoon et al. 2011), podczas gdy u ludzi NLGN4 umiejscowiona jest głównie na synapsach pobudzających w korze mózgowej (Marro et al. 2019).



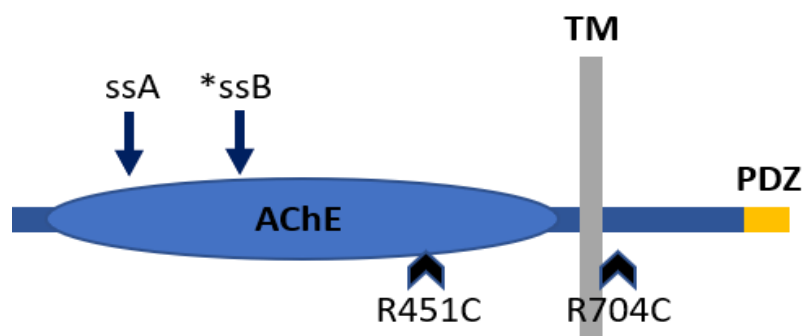
Rycina 4. Lokalizacja poszczególnych izoform neurologin na synapsach pobudzających i hamujących.

1.5.2. Domenowa budowa neurologin

Neurologiny są białkami transbłonowymi z N-końcem umiejscowionym w szczelinie synaptycznej i C-końcem zakotwiczonym w błonie postsynaptycznej. Od strony N-końca neurologiny posiadają długi region zewnątrzkomórkowy z domeną homologiczną do acetylocholinoesterazy (AChE), który zawiera region odpowiedzialny za dimeryzację. Następnie występuje region ulegający silnej glikozylacji oraz domena kotwicząca w błonie komórkowej (Rycina 5). Krótki C-koniec zawiera domenę wiążącą PDZ klasy I, przez którą neurologiny obecne na synapsach oddziałują z białkami strukturalnymi wchodzącymi w skład gęstości postsynaptycznej: PSD-95 na synapsach pobudzających i gefryną na synapsach hamujących (Giannone et al. 2013), wpływając pośrednio na działanie receptorów takich jak jonotropowe receptory dla kwasu glutaminowego AMPA i NMDA (Jang, Lee, and Kim 2017). Domena zewnątrzkomórkowa jest silniej zachowana pomiędzy izoformami neurologin niż domena cytoplazmatyczna (Bemben, Shipman, et al. 2015). Wykazano, że każda z domen w inny sposób wpływa na właściwości neurologin, co jest zależne od typu synapsy, na której to białko się znajduje (Nguyen, Horn, and Nicoll 2016).

Cztery geny kodujące neurologiny, proces alternatywnego składania oraz modyfikacje potranslacyjne wpływają na powstanie wariantów neurologin, które pełnią specyficzne funkcje dostosowane do danej synapsy (Sudhof 2008). Domena

zewnątrzkomórkowa zawiera dwa alternatywne miejsca składania ssA i ssB, które wpływają na specyfikę oddziaływania neuroligin z białkami presynaptycznymi i funkcje synaptyczne. Wariant składania ssB jest obecny tylko w neuroliginie 1 (Chih, Gollan, and Scheiffele 2006; Ichtchenko, Nguyen, and Sudhof 1996). Dodatkowa kontrola ekspresji genów neuroligin następuje poprzez modyfikacje potranslacyjne (Jeong, Paskus, and Roche 2017). Zalicza się do nich glikozylację, liczne fosforylacje np. przez CAMKII oraz sugerowane cięcie proteolityczne mające wpływ na funkcje tych białek (Chubykin et al. 2007; Bembien et al. 2014).

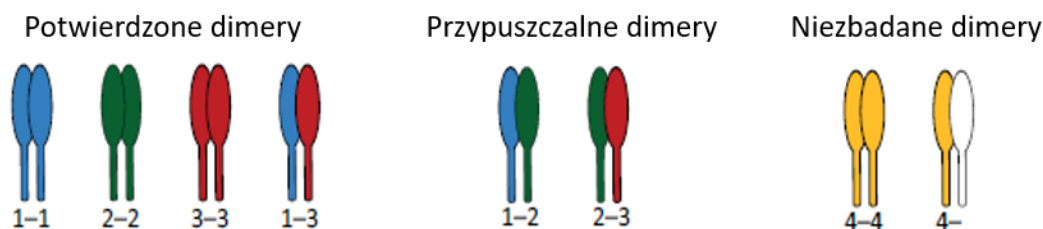


Rycina 5. Domenowa budowa białek neuroligin. Białka neuroligin składają się z trzech domen: homologicznej do acetylocholinesterazy (AChE), transbłonowej (TM) i domeny wiążącej białka zawierające motyw PDZ. Zaznaczono miejsca alternatywnego składania mRNA ssA i ssB (*ssB występuje tylko w NLGN1) oraz miejsca wykrytych mutacji korelujących z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Na podstawie (Cao and Tabuchi 2017).

1.5.3. Dimeryzacja neuroligin i kierowanie na błonę postsynaptyczną

Wykazano, że neuroliginy obecne na błonie postsynaptycznej funkcjonują w postaci dimerów (Comoletti et al. 2003). Proces dimeryzacji zachodzi w retikulum endoplazmatycznym, gdzie mogą powstać homodimery NLGN1/NLGN1, NLGN2/NLGN2, NLGN3/NLGN3 lub heterodimery neuroligin zawierające NLGN1/NLGN3 i NLGN2/NLGN3 (Poulopoulos et al. 2012; Budreck and Scheiffele 2007). Istnieją też wstępne doniesienia o występowaniu śladowej ilości dimerów NLGN1/NLGN2 (Poulopoulos et al. 2012). Ze wszystkich rodzajów heterodimerów NLGN1/NLGN3 są najpowszechniejsze w mózgu, co zaobserwowano analizując ich występowanie w neuronach hipokampa, prążkowia oraz mózdzku (Poulopoulos et al. 2012). Biorąc pod uwagę lokalizację neuroligin na pobudzających lub hamujących synapsach, można przypuszczać, że oligomeryzacja neuroligin stanowi proces regulujący

ich działanie na tych synapsach. Podsumowanie dotychczasowej wiedzy o dimeryzacji neuroligin przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Zestawienie stanu obecnej wiedzy na temat dimeryzacji neuroligin.

Powstałe w aparacie Golgiego dimery neuroligin są następnie poprzez system pęcherzyków wydzielniczych kierowane na błonę postsynaptyczną, gdzie pełnią funkcje synaptyczne. Udowodniono, że kierowanie NLGN1 oraz prawdopodobnie NLGN3 na błonę postsynaptyczną jest dynamicznie regulowane przez oddziaływanie z białkiem PSD-95 (Jeong et al. 2019).

1.5.4. Podstawowe funkcje neuroligin i charakterystyka myszy pozbawionych ekspresji neuroligin

Neuroliginy zaliczane są do białek adhezyjnych będących tzw. „organizatorami” synapsy. Badania ostatnich lat wskazują na ważną rolę neuroligin nie tylko w utrzymaniu fizycznego pomostu pomiędzy komórkami, ale przede wszystkim w organizacji tej struktury i regulacji funkcji receptorów, co zapewnia prawidłowe przewodnictwo synaptyczne i prowadzi do specyfikacji całych sieci neuronalnych (Cao and Tabuchi 2017).

Po uzyskaniu nadekspresji neuroliginy 1 i 2 w ludzkich komórkach HEK293 zauważono powstawanie „synapsy” pomiędzy komórką HEK293 i współhodowanymi neuronami (Scheiffele et al. 2000). Powyższa obserwacja wskazywała na potencjał synaptogenny neuroligin. Okazało się też, że nadekspresja neuroligin w neuronach zwiększa liczbę synaps (Chih et al. 2004). Ligand neuroligin kluczowy dla utworzenia synapsy poznano w wyniku doświadczeń zaprojektowanych w odwrotną stronę. W wyniku transfekcji presynaptycznych neureksyn do komórek HEK293 i COS zaobserwowano zbliżenie części postsynaptycznej neuronów oraz powstanie „synapsy” (Graf et al. 2004; Nam and Chen 2005). Powyższe wyniki stworzyły silne podstawy, by

uznać neuroliginy za kluczowe białka uczestniczące w powstawaniu obu typów synaps – pobudzających i hamujących. Później okazało się jednak, że neuroliginy są kluczowe nie tylko do utworzenia oraz utrzymania i organizacji synapsy, ale przede wszystkim do regulacji transmisji synaptycznej. Tę tezę postawiono na podstawie wstępnych wyników, które udowodniły, że redukcja poziomu ekspresji neuroligin za pomocą shRNA skutkuje obniżonym przewodnictwem synaptycznym (Chih et al., 2005).

By poznać funkcję neuroligin *in vivo* stworzono myszy pozbawione ekspresji wszystkich trzech izoform neuroligin (Varoquaux et al. 2006). Okazało się, że tworzą one synapsy, mają prawidłową ich liczbę oraz ultrastrukturę, choć myszy te umierają w ciągu dwudziestu czterech godzin po urodzeniu w wyniku problemów z oddychaniem będących konsekwencją dramatycznie obniżonej transmisji synaptycznej i aktywności neuronalnej w pniu mózgu, co uniemożliwiło kontrolę tak podstawowego procesu jak oddychanie (Varoquaux et al. 2006). Częstotliwość spontanicznych prądów glutaminergicznych u opisywanych myszy była obniżona o 75%, a GABAergicznych/glycinergicznych aż o 90% (Varoquaux et al. 2006; Xu, Xia, and Xia 2012). Zaobserwowano też zmniejszoną ekspresję receptorów GABA_A, zmniejszoną ilość pęcherzyków synaptycznych, choć ekspresja białek takich jak PSD-95 i gefryna była w normie (Varoquaux et al. 2006).

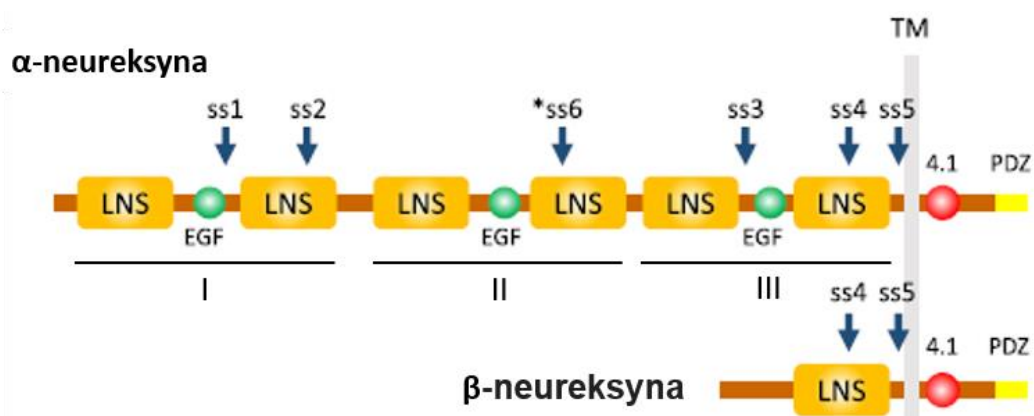
Myszy *Nlgn1* KO, *Nlgn2* KO i *Nlgn3* KO przeżywają, ale analiza elektrofizjologiczna również wykazała znaczące dysfunkcje synaptyczne, odpowiednio na synapsach pobudzających, hamujących lub obu typach synaps, co jest zgodne z lokalizacją tych białek (Chubykin et al. 2007; Hoon et al. 2017; Modi et al. 2019). Zaburzenia w przekaźnictwie były obecne również u myszy z pozbawionych ekspresji dwóch genów neuroligin (Chubykin et al. 2007). W badaniach behawioralnych wykazano, że myszy *Nlgn3* KO oraz myszy z wprowadzoną mutacją R451C wykazują brak plastyczności reakcji, ale nie mają zaburzeń w pamięci relacyjnej (Norris et al. 2019).

Podsumowując, badania z wykorzystaniem myszy transgenicznych dowodzą, że nieprawidłowości w ekspresji neuroligin są przyczyną zaburzeń w przekaźnictwie synaptycznym, co sugeruje ich udział w regulacji funkcji receptorów synaptycznych.

1.5.5. Oddziaływanie neuroligin z innymi białkami

1.5.5.1. Neureksyny – główny partner neuroligin

Presynaptyczne białka - neureksyny są głównym partnerem postsynaptycznych neuroligin. Neureksyny zostały pierwotnie opisane jako receptor dla α -latrotoksyny, która wchodzi w skład jadu pająka czarnej wdowy i wywołuje paraliż u ssaków (Ushkaryov et al. 1992). Neureksyny są kodowane przez trzy geny: *Nrxn1*, *Nrxn2* i *Nrxn3* (Dean and Dresbach 2006). Każdy gen neureksyn posiada dwa promotory, z których powstaje dłuższa forma białka zwana α -neureksyną lub krótsza forma białka określana mianem β -neureksyny (Ichtchenko et al. 1995). Powstałe w ten sposób transkrypty (*Nrxn1 α* , *Nrxn1 β* , *Nrxn2 α* itd.) podlegają następnie złożonemu alternatywnemu składaniu (wykorzystanie alternatywnych egzonów, miejsc donorowych i akceptorowych splicingu) w pięciu miejscach w przypadku α -neureksyn lub w dwóch miejscach u β -neureksyn (Missler, Fernandez-Chacon, and Sudhof 1998). Łącznie, możliwe jest powstanie więcej niż 2000 wariantów składania, co sugeruje, że neureksyny pełnią ważną rolę w określeniu specyficzności każdej synapsy (Missler and Sudhof 1998). Co więcej, proces N- i O-glikozylacji przyczynia się do dodatkowej różnorodności tej grupy białek (Craig and Kang 2007). Powstałe białka są strukturalnie podobne do lamininy, agryny i innych białek zaangażowanych we wzrost stożka aksonu i synaptogenezę.



Rycina 7. Domenowa budowa białek neureksyn. LNS – domena składająca się z lamininy, neureksyny, globuliny wiążącej hormon płci; EGF – domena przypominająca naskórkowy czynnik wzrostu; TM – domena transbłonowa; 4.1 – sekwencja wiążąca białko, PDZ – domena wiążąca białka zawierające motyw PDZ; ss – miejsca alternatywnego składania mRNA (*ss6 nie występuje w neureksynie 2). Na podstawie (Cao and Tabuchi 2017).

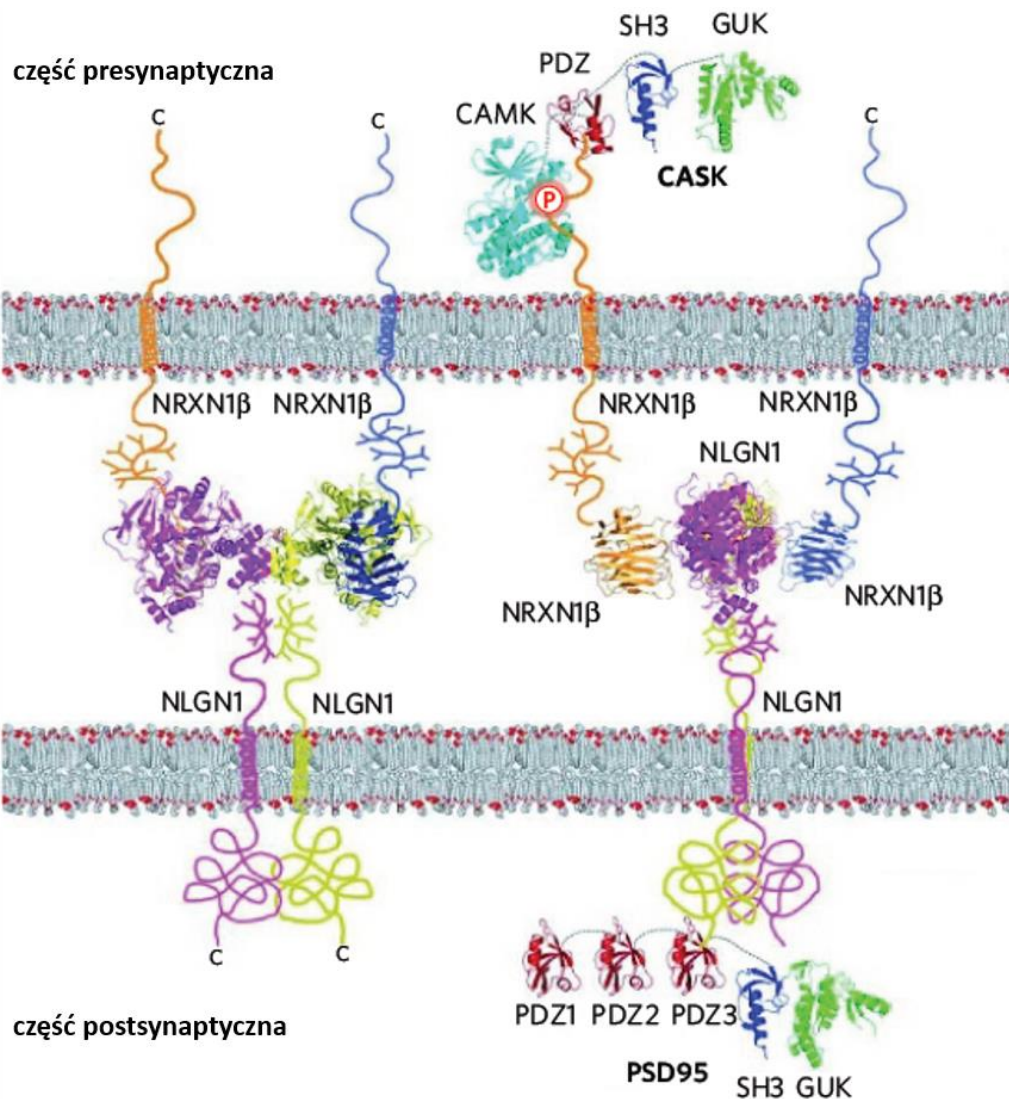
Neureksyny α i β mają identyczne regiony wewnątrzkomórkowe, ale różne domeny zewnątrzkomórkowe (Rycina 7). Neureksyny α zawierają trzy powtórzenia składające się z domeny LNS (laminina, neureksyna, globulina wiążąca hormon płci), domeny przypominającej EGF (naskórkowy czynnik wzrostu, ang. epidermal growth factor) i domeny LNS w ich regionie zewnątrzkomórkowym, domenę transbłonową (TM) i krótki cytoplazmatyczny fragment z sekwencją wiążącą białko 4.1 i domeną wiążącą białka zawierające motyw PDZ klasy II. Neureksyny β zawierają tylko jedną domenę LNS w rejonie zewnątrzkomórkowym (Sudhof 2008; Dean and Dresbach 2006).

Na poziomie komórkowym neureksyny wykazują szeroki i nakładający się wzorzec ekspresji w mózgu, a większość neuronów wykazuje ekspresję wielu izoform neureksyn. Obecność neureksyny 1, 2 i 3 stwierdzono zarówno na synapsach pobudzających jak i hamujących, dlatego nie ma klasyfikacji neureksyn ze względu na typ synapsy (Sudhof 2008). Domena cytoplazmatyczna odpowiada za oddziaływanie neureksyn z innymi białkami presynaptycznymi takimi jak synaptotagmina, syntetyna, CASK (ang. calcium/calmodulin dependent serine protein kinase) czy Mint (Hata et al. 1993; Hata, Butz, and Sudhof 1996; Biederer and Sudhof 2000). Podejrzewa się, że poprzez te interakcje neureksyny wpływają na fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i egzocytozę neurotransmiterów oraz regulują działanie kanałów wapniowych (Missler et al. 2003). Neureksyny przyczyniają się do właściwej lokalizacji oraz funkcji wielu ważnych białek synaptycznych (Sudhof 2008). Najlepiej poznana jest NRXN1 α , która oddziałuje z wieloma ligandami, włączając neuroliginy i receptory GABA (Chen et al. 2011). Poza neuroliginą, dodatkowi partnerzy neureksyn to neureksofilina, kolibistyna, cerebelina, dystroglikan, kalsyntenina i LRRTM2 (ang. leucine-rich repeat transmembrane protein) (Baudouin and Scheiffele 2010; Sudhof 2018). Żeby ocenić funkcję neureksyn *in vivo* stworzono myszy pozbawione wszystkich trzech α -neureksyn (Missler et al. 2003). Myszy te przeżywają tylko kilka dni i wykazują znacznie osłabione przekazywanie synaptyczne na synapsach pobudzających i hamujących w wyniku braku regulacji działania kanałów wapniowych i wpływu na funkcje innych kluczowych białek na synapsie (Missler et al. 2003). Te oraz inne badania z użyciem hodowli komórkowych wykazały, że neureksyny nie są niezbędne do samego procesu synaptogenezy, ale regulują lokalizację i funkcję presynaptycznych kanałów wapniowych (Dudanova et al. 2007; Etherton et al. 2009). Z kolei, myszy pozbawione

ekspresji α -neureksyny 1 wykazują osłabione przekaźnictwo synaptyczne w korze mózgowej i hipokampie, co skutkuje deficytami w zachowaniach społecznych oraz uczeniu się i pamięci (Etherton et al. 2009).

1.5.5.2. Kompleks neurologin i neureksyn na synapsie

W celu zapewnienia fizycznego kontaktu pomiędzy częścią pre- i postsynaptyczną dimer neurologin oddziałuje z dwoma monomerami neureksyny 1 β tworząc heterotetramer - heterofilowy kompleks składający się z czterech białek (Rycina 8). W 2007 roku poznano strukturę krystaliczną tego kompleksu (Arac et al., 2007; Fabrichny et al., 2007; Levinson and El-Husseini, 2007). Udowodniono, że białka wiążą się ze sobą za pośrednictwem dużego fragmentu domeny AChE neurologiny i domeny LNS neureksyny. Ligandy tego kompleksu wykazują nanomolarne powinowactwo względem siebie (Arac et al. 2007), a do interakcji konieczna jest obecność dwuwartościowych jonów wapnia (Reissner et al. 2008). Wiązanie jest zależne od wariantów składania, gdyż dowiedziono, że w tym wiązaniu uczestniczy tylko neureksyna zawierająca wariant składania SS4. Miejsca alternatywnego składania w neurologinie 1 i neureksynie 1 β są umiejscowione blisko powierzchni oddziaływania, co wyjaśnia ich udział tym wiązaniu (Chen et al. 2008). Co ciekawe, odkryto, że w powstaniu kompleksu neurologin-neureksyn w pobudzających synapsach wzgórzowo-korowych bierze udział hewina – białko o właściwościach synaptogennych wydzielane przez astrocyty, co jest konieczne do synaptogenezy i plastyczności w rozwijającej się korze wzrokowej (Singh et al. 2016).



Rycina 8. Model atomowy schematycznie prezentujący trójwymiarową strukturę heterotertameru składającego się z dimeru neuroliginy 1 i dwóch monomerów neureksyny 1 β . PDZ – domena oddziałująca z C-końcem białek transbłonowych; SH3 – domena homologii 3 SRC; GUK – domena kinazy guanylanowej; Białkowa kinaza serynowa zależna od wapnia i kalmoduliny z rodziny MAGUK. Na podstawie (Sudhof 2008).

1.5.5.3. Oddziaływanie neuroligin z receptorami i innymi białkami synaptycznymi

Badania ostatnich lat wskazują, że rola neuroligin znacznie wykracza poza zapewnienie kontaktu części pre- i postsynaptycznej synapsy. Okazuje się, że poza interakcją z partnerami presynaptycznymi neuroliginy oddziałują też z receptorami umiejscowionymi w błonie postsynaptycznej i regulują poziom ich ekspresji na synapsie, co może mieć znaczenie zarówno strukturalne (udział w plastyczności synaptycznej), jak

i funkcjonalne (regulacja przekazania sygnału) (Jang, Lee, and Kim 2017; Haas et al. 2018; Mondin et al. 2011; Heine et al. 2008).

Wykazano bezpośrednio i pośrednio oddziaływanie NLGN z receptorami NMDA i AMPA (Jang, Lee, and Kim 2017). Oddziaływanie NLGN1 z receptorem NMDA obserwowano w wielu rejonach mysiego mózgu takich jak: hipokamp (Budreck et al. 2013; Blundell et al. 2010; Jiang et al. 2017; Shipman and Nicoll 2012; Shipman et al. 2011; Jedlicka et al. 2015), korę mózgową (Kwon et al. 2012), prążkowie (Espinosa et al. 2015), ciało migdałowate (Jung et al. 2010) i mózdzek (Zhang and Sudhof 2016). Według konwencjonalnej teorii regulacja funkcji receptorów następuje pośrednio poprzez oddziaływanie np. NLGN1 z białkiem PSD-95, które fizycznie łączy się z receptorami NMDA lub TARPs (transbłonowymi białkami pomocniczymi AMPA) związanymi z receptorami AMPA (Mondin et al. 2011; Krueger et al. 2012). Obecnie testuje się hipotezę, że białka adhezyjne takie jak neuroliginy mogą oddziaływać z receptorami bezpośrednio w szczeliny synaptycznej, a to oddziaływanie ma kluczowe znaczenie dla stabilności całego kompleksu białek synaptycznych i kontroli siły przewodnictwa synaptycznego (Jang, Lee, and Kim 2017; Krueger et al. 2012). Przykładowo, zależność tę zaprezentowano dla interakcji *in-cis* NLGN1 z jednostką GluN1 receptora NMDA (Budreck et al. 2013). Co więcej, wykryto, że zewnątrzkomórkowy rejon NLGN1 wystarczy by przywrócić funkcje synaptyczne receptora NMDA spowodowane brakiem ekspresji NLGN1 oraz obniżeniem ekspresji NLGN3 (Soler-Llavina et al. 2011). Wykazano, że aminokwasem kluczowym do regulacji pobudzających prądów postsynaptycznych EPSC (ang. excitatory postsynaptic currents) pochodzących od receptorów NMDA i AMPA przez NLGN1 jest kwas glutaminowy znajdujący się w pozycji 747 w regionie cytoplazmatycznym NLGN1, ale nie obejmującym motywu PDZ (Shipman et al. 2011).

Z kolei w przypadku białka NLGN3 do regulacji synaptycznej transmisji zależnej od receptora AMPA jest niezbędny aminokwas w pozycji 740. Do wzmocnienia transmisji hamującej przez NLGN3 konieczna jest także obecność NLGN2 (Shipman et al. 2011; Nguyen, Horn, and Nicoll 2016). Dużo informacji o udziale NLGN3 w regulacji funkcji receptorów NMDA i AMPA uzyskano dzięki mutacjom w genie NLGN3, które opisano w dalszej części pracy.

Wykazano, że neuroliginy mogą wchodzić w interakcję również z innymi białkami. Wśród nich jest białko MDGA, które oddziałuje *in cis* z neuroliginą 1 i 2. Udowodniono, że białko MDGA blokuje wiązanie neuroligin z neureksynami zarówno na synapsach pobudzających (Connor et al. 2016) jak i hamujących (Pettem et al. 2013), w wyniku czego następuje redukcja ich funkcji. Co więcej, niedawno dowiedziono, że oddziaływanie NLGN1 z białkiem tetraspaniny TSPAN5 jest kluczowe dla właściwego poziomu NLGN1 na błonie postsynaptycznej i dojrzewania kolców dendrytycznych (Moretto et al. 2019).

1.5.6. Proteoliza neuroligin i znaczenie tego procesu w rozwoju nowotworów mózgu

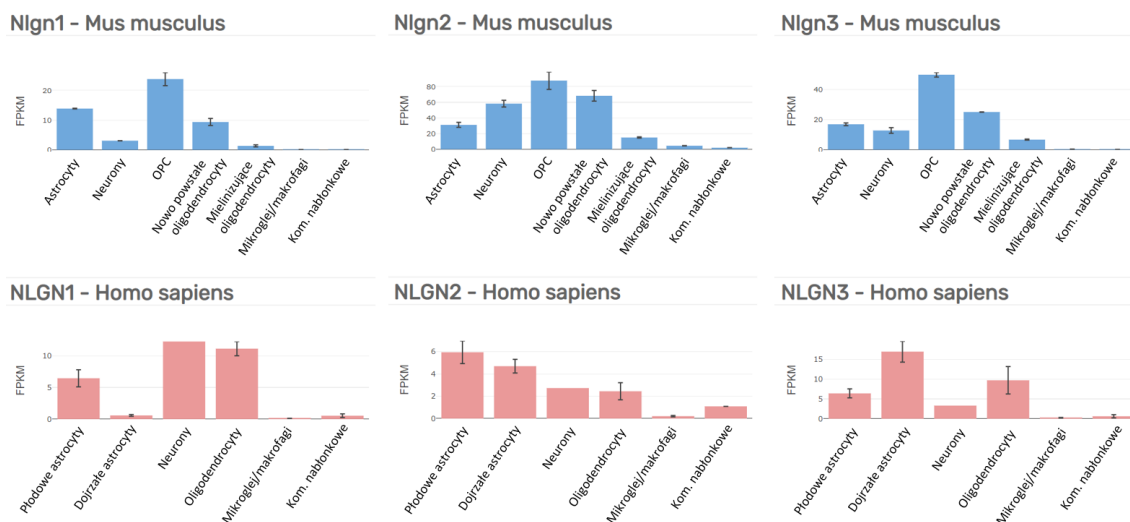
Jednym z mechanizmów wykorzystywanych przez neuron do regulacji struktury, liczby i funkcji synaps jest kontrolowane przez aktywność synaptyczną enzymatyczne cięcie białek ulegających ekspresji na powierzchni błon synaptycznych. Proces ten umożliwia plastyczność synaptyczną poprzez uwolnienie synaps od ograniczeń zapewnianych przez macierz zewnątrzkomórkową (Sonderregger and Matsumoto-Miyai 2014; Lee, Tsang, and Birch 2008). Dwa niezależne zespoły badawcze w tym samym czasie udowodniły, że NLGN1 ulega cięciu proteolitycznemu na synapsie (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012). Używając podejścia farmakologicznego i genetycznego, autorzy zasugerowali, że ADAM10 (białko zawierające domenę dezintegryny i metaloproteinazy 10) (Suzuki et al. 2012) i/lub MMP-9 (metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9) (Peixoto et al. 2012) są głównymi proteazami odpowiedzialnymi za uwalnianie domeny zewnątrzkomórkowej NLGN1. Ponadto zasugerowano, że pozostały C-końcowy fragment NLGN1 jest cięty przez presenilinę/ γ -sekretazę (Suzuki et al. 2012). W inicjacji procesu cięcia uczestniczy CAMKII (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012). Następnie pojawiły się doniesienia na temat istotnej funkcji tego procesu (Korshunova et al. 2015; Gjorlund et al. 2017). Wykryto, że odcięty zewnątrzkomórkowy fragment NLGN1 oddziałuje z metabotropowym receptorem dla glutaminianu 2 (mGluR2) i tym samym zmniejsza aktywność synaptyczną (Gjorlund et al. 2017). Cięcie NLGN1 przez ADAM10 zostało też potwierdzone przez identyfikację przeciętych fragmentów NLGN1 w pożywce znad neuronów korowych (Kuhn et al. 2016).

W trakcie powstawania niniejszej pracy doktorskiej pojawiło się szczególne zainteresowanie tym aspektem regulującym poziom ekspresji neuroligin na synapsie,

zwłaszcza dla NLGN3 (Bemben et al. 2019). Cięcie NLGN3 przez proteazę ADAM10 zostało zasugerowane w badaniach proteomicznych (Kuhn et al. 2016). Za pomocą tej samej metody Venkatesh i wsp. zakomunikowali obecność peptydów reprezentujących przecięty N-końcowy fragment NLGN3 w pożywce znad optogenetycznie stymulowanych skrawków kory mózgowej (Venkatesh et al. 2015). Co niezwykle istotne, okazało się, że przecięty fragment NLGN3 wydzielany w wyniku aktywności neuronalnej jest mitogenem stymulującym wzrost nowotworów mózgu – glejaków (Lehrman & Stevens 2015, Thompson & Sontheimer 2015, Venkatesh et al. 2015). W tym przypadku również wstępnie zasugerowano udział ADAM10 oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej jak np. MMP-9/13 w tym procesie (Venkatesh et al. 2017). W świetle tych doniesień zbadanie dokładnego mechanizmu proteolizy NLGN3 oraz innych neuroligin wydaje się być niezwykle ważne.

1.5.7. Neuroliginy w komórkach glejowych

Według teorii synapsy trójdzielnej pewnej części synaps towarzyszą astrocyty (Perea, Navarrete, and Araque 2009). Wykazano, że mRNA *Nlgns* są też obecne w komórkach glejowych takich jak astrocyty, prekursorzy oligodendrocytów (OPCs), dojrzałe oligodendrocyty czy mikroglej (Rycina 9). Te ilościowe dane zebrano zarówno z kory mózgowej myszy (Zhang et al. 2014), jak i człowieka (Zhang et al. 2016). Co więcej, ostatnio udowodniono, że obecne w korowych astrocytach neuroliginy są odpowiedzialne za morfogenezę astrocytów oraz synaptogenezę poprzez interakcję z neuronalnymi neureksynami (Stogsdill et al. 2017). Obecnie coraz więcej danych wskazuje, że neuroliginy w komórkach glejowych mają wpływ na synaptogenezę i funkcję synaps (Sakers and Eroglu 2019).



Rycina 9. Poziom ekspresji RNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* w poszczególnych komórkach uzyskanych z kory mózgowej myszy (P7) i człowieka (płat skroniowy, 8-63 lata) zmierzony za pomocą metody sekwencjonowania RNA. OPC – komórki prekursorowe oligodendrocytów; FPKM – liczba zsekwencjonowanych fragmentów na kilobazę sekwencji transkrypcyjnej na milion zmapowanych fragmentów (ang. fragments per kilobase of transcript sequence per million mapped fragments). Na podstawie http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html (Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2016).

1.5.8. Mutacje w genach neuroligin są przyczyną zaburzeń ze spektrum autyzmu

W 2003 roku odkryto, że mutacje pojedynczego nukleotydu w genach *Nlgn3* i *Nlgn4X* silnie korelują z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu (Jamain et al. 2003). Mutacje *Nlgn3*^{R451C} (skutkująca zmianą aminokwasu z argininy na cysteinę) i *Nlgn4X*^{D396X} (wprowadzająca kodon STOP na miejsce kwasu asparaginowego) zostały wykryte u szwedzkiej rodziny z objawami zaburzeń ze spektrum autyzmu i zespołu Aspergera w wyniku sekwencjonowania egzomowego (Jamain et al. 2003). Rok później ukazała się publikacja opisująca delecję dwóch par zasad w genie *Nlgn4* w pozycji Xp22.33 (wprowadzająca kodon STOP w domenie odpowiedzialnej za dimeryzację) we francuskiej rodzinie z objawami autyzmu i upośledzenia intelektualnego (Laumonnier et al. 2004). Doniesienia te wzbudziły zainteresowanie lekarzy genetyków oraz naukowców genem neuroligin. Okazało się, że odkryte mutacje na poziomie molekularnym zaburzają synaptyczną lokalizację neuroligin 3 i 4 (Jamain et al. 2003). Dalsze badania przeprowadzone z użyciem hodowli komórkowych oraz mysiego modelu (z wprowadzonymi mutacjami scharakteryzowanymi u pacjentów) wykazały, że

zidentyfikowane mutacje powodują zaburzenie kierowania neuroligin na błonę postsynaptyczną, ich zmniejszony poziom w synapsie oraz wynikające z tego faktu nieprawidłowe przewodnictwo synaptyczne (Chih et al. 2004; Chanda et al. 2016; Zhang et al. 2009; De Jaco et al. 2006; Tabuchi et al. 2007; Etherton, Tabuchi, et al. 2011; Cao and Tabuchi 2017; Comoletti et al. 2004).

W wyniku dalszych badań odkryto kolejne warianty genów *Nlgn* i *Nrxn* takie jak: polimorfizm liczby kopii DNA (ang. copy number variations, CNVs), delecje, mutacje punktowe, mutacje zmiany sensu, które jak się okazało korelują z występowaniem chorób neurorozwojowych włączając w to zaburzenia ze spektrum autyzmu (Cao and Tabuchi 2016). Co więcej, niedawno dowiedziono również, że mutacje w genach neuroligin są związane ze schizofrenią (Mackowiak, Mordalska, and Wedzony 2014).

1.5.9. Charakterystyka wybranych mutacji w genach neuroligin

1.5.9.1. Mutacja *Nlgn3*^{R451C}

Mutacja R451C w genie *Nlgn3* jest substytucją pojedynczego nukleotydu skutkującą zmianą aminokwasu z argininy na cysteinę w silnie zachowanym w ewolucji miejscu w zewnątrzkomórkowej domenie AChE (Rycina 5). Ta mutacja zaburza kierowanie neuroligin 3 na błonę postsynaptyczną (Comoletti et al. 2004). W komórkach COS i HEK293 wykazano, że 90% białek z mutacją NLGN3^{R451C} ulega zatrzymaniu w śródplazmatycznej (ang. endoplasmic reticulum, ER), a następnie degradacji na skutek błędnego fałdowania (ang. misfolding) domeny zewnątrzkomórkowej białka (Chih et al. 2004). W tym przypadku aktywowany jest szlak adaptacyjnej odpowiedzi na stres zwany UPR (ang. unfolded protein response), czyli odpowiedź na obecność nieprawidłowo sfałdowanych białek (Ulbrich et al. 2016). Niemniej jednak wiadomo, że około 10% białek NLGN3^{R451C} jest transportowane na błonę postsynaptyczną i tam ulega ekspresji zachowując część swoich funkcji, ale wykazując brak lub zmniejszone oddziaływanie z neureksyną 1β, co zmniejsza potencjał synaptogenny neuroligin (Comoletti et al. 2004; Chih et al. 2004).

Myszy z wprowadzoną mutacją *Nlgn3*^{R451C} (knock-in, KI) mają deficyty w zachowaniach społecznych i funkcjach synaptycznych (Tabuchi et al. 2007). Myszy te wykazują zwiększone zdolności do uczenia przestrzennego oraz zapamiętywania, co zostało sprawdzone w labiryncie wodnym Morrisa. Udowodniono, że profil aktywności

elektrofizjologicznej neuronów myszy *Nlgn3*^{R451C} knock-in mierzony za pomocą metody elektroencefalografii (EEG) jest znacznie zaburzony zarówno dla stanu czuwania, jak i snu (Liu et al. 2017). Pomimo normalnej ilości synaps pobudzających i hamujących myszy wykazują wybiórczy wzrost w częstotliwości miniaturowych hamujących prądów synaptycznych (ang. miniature inhibitory postsynaptic currents, mIPSCs) i amplitudzie wywołanych prądów IPSC w komórkach piramidowych w warstwie 2/3 kory somatosensorycznej (Tabuchi et al. 2007). Z kolei, doświadczenia z użyciem neuronów CA1 hipokampa wykazały, że mutacja *Nlgn3*^{R451C} wzmacnia przekaźnictwo zależne od AMPA, opóźnia zanik pobudzających prądów postsynaptycznych EPSC z receptora NMDA, zwiększa ilość NMDAR zawierających podjednostkę GluN2B i wzmacnia długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. long-term potentiation, LTP) zależne od NMDA (Etherton, Foldy, et al. 2011). Powyższe wyniki sugerują, że mutacja *Nlgn3*^{R451C} wprowadzona do NLGN1 też może zmieniać synaptyczną transmisję zależną od receptorów AMPA i NMDA.

Co więcej, GABAergiczne przekaźnictwo synaptyczne z komórek koszyczkowych neuronów parwalbuminowych (PV) do neuronów piramidowych jest zmniejszone w regionie CA1 hipokampa (Foldy, Malenka, and Sudhof 2013) oraz warstwie 4 kory somatosensorycznej (Cellot and Cherubini 2014) myszy *Nlgn3*^{R451C}, ale nie zmienione w warstwie 2/3 kory (Speed et al. 2015). Co ciekawe, myszy *Nlgn3* KO nie prezentują żadnego z tych fenotypów. Szereg danych wskazuje też, że mutacja *Nlgn3*^{R451C} zaburza działanie szlaku endokannabinoidowego (Speed et al. 2015).

1.5.9.2. Mutacja *Nlgn4X*^{R704C}

Mutacja R704C w genie *Nlgn4X* to substytucja pojedynczego nukleotydu skutkująca zmianą aminokwasu z argininy na cysteinę, która jest jedyną mutacją neurologin zlokalizowaną w domenie cytoplazmatycznej (Yan et al. 2005). Występująca u ludzi mutacja *Nlgn4X*^{R704C} jest zlokalizowana w miejscu zachowanym w ewolucji pomiędzy izoformami neurologin. Poziom ekspresji NLGN4 w mózgu myszy jest niski, dlatego aby sprawdzić jakie skutki wywołuje mutacja *Nlgn4X*^{R704C} u ludzi wprowadza się ją do genu *Nlgn3* u myszy (Bolliger et al. 2008).

W przeciwieństwie do R451C, mutacja R704C nie zmienia lokalizacji powierzchniowej ani aktywności synaptycznej neurologiny 3 i 4, ale znacząco zmienia

funkcję tego białka, co zbadano za pomocą badań elektrofizjologicznych (Etherton, Tabuchi, et al. 2011). Myszy z wprowadzoną mutacją *Nlgn3*^{R704C} mają prawidłową liczbę synaps pobudzających i hamujących w hipokampie i korze somatosensorycznej (Etherton, Tabuchi, et al. 2011). Zaobserwowano zmniejszoną częstotliwość prądów synaptycznych zależnych od AMPA, ale nie od receptorów NMDA i GABA (Chanda et al. 2013; Etherton, Tabuchi, et al. 2011), co wynika ze wzmożonej internalizacji AMPAR i spadku poziomu tych receptorów na błonie postsynaptycznej u myszy z wprowadzoną mutacją *Nlgn3*^{R704C} (Chanda et al. 2016). Co zaskakujące, ta sama mutacja w genie *Nlgn4* zwiększa odpowiedź synaptyczną zależną od receptorów AMPA (Chanda et al. 2016). Wykazano również, że mutacja *Nlgn4X*^{R704C} hamuje fosforylację treoniny w pozycji 707 w neuroiginie 4X przez kinazę białkową C (Bemben, Nguyen, et al. 2015). Co więcej, niedawno przeprowadzone badania *in vitro* na neuronach wyhodowanych z ludzkich komórek macierzystych pokazały, że mutacja *Nlgn4X*^{R704C} zwiększa ilość synaps pobudzających oraz zwiększa potencjał do przekazywania sygnału, zaś genetyczne pozbawienie ich NLGN4 nie powoduje tego fenotypu (Marro et al. 2019).

Co istotne, wpływ mutacji *Nlgn3*^{R451C} i *Nlgn3*^{R704C} na kierowanie receptorów AMPA do miejsc docelowych oraz ich funkcje synaptyczne ulega kompensacji, ale tylko w trakcie rozwoju (Zhang et al. 2017). Zaobserwowano, że konstytutywne lub warunkowe pozbawienie ekspresji genu *Nlgn3* we wczesnym rozwoju myszy ma minimalny wpływ na funkcje receptorów AMPA. Z kolei, warunkowe pozbawienie ekspresji genu *Nlgn3* w późnym rozwoju myszy lub wprowadzenie mutacji *Nlgn3*^{R451C} i *Nlgn3*^{R704C} mocno upośledza funkcje tych receptorów (Zhang et al. 2017).

1.6. Zaburzenia ze spektrum autyzmu

1.6.1. Epidemiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. autism spectrum disorder, ASD) stanowią grupę heterogennych zaburzeń neurorozwojowych (Bailey, Phillips, and Rutter 1996), które dotyczą łącznie około 21,7 milionów ludzi na świecie, w tym obejmują 1:59 dzieci w wieku 4 lat (Polsek et al. 2011; Christensen et al. 2019). Według najnowszych statystyk ze Stanów Zjednoczonych częstość występowania ASD stanowi nawet około 2-3% całej populacji (Christensen et al. 2019). Stała jest przewaga zachorowań wśród płci męskiej i wynosi średnio 3:1 w stosunku do płci żeńskiej (Loomes, Hull, and Mandy 2017).

Zaburzenia ze spektrum autyzmu charakteryzują się upośledzeniem komunikacji i interakcji społecznych oraz ograniczonym, powtarzającym się i stereotypowym wzorcem zachowań czy aktywności (Wozniak et al. 2016; Baribeau et al. 2020). Osoba z ASD w inny niż typowy dla większości populacji sposób postrzega świat i myśli o otoczeniu, często wykazując większe zainteresowanie zjawiskami nieożywionymi niż ludziami (Huguet, Ey, and Bourgeron 2013). Dodatkowo, szacuje się, że nawet 40-80% dzieci z ASD ma poważne problemy ze snem (Esposito et al. 2020; Cortesi et al. 2010).

1.6.2. Obraz kliniczny i diagnostyka zaburzeń ze spektrum autyzmu

Klinicznie pacjenci są bardzo zróżnicowani – od niemal niezauważalnych powyższych objawów do niepełnosprawności intelektualnej, która dotyczy 30-50% osób z ASD (Wozniak et al., 2016). Na przykład osoby z zespołem Aspergera nie wykazują upośledzenia umysłowego (Baskin, Sperber, and Price 2006). Dodatkowo, u części osób z ASD mogą współwystępować problemy z mową, padaczka diagnozowana nietypowym zapisem badania EEG (elektroencefalografii), ADHD (zespół nadpobudliwości z deficytem uwagi), zaburzenia układu pokarmowego (Wozniak et al. 2016). Z cech zewnętrznych pacjenta z ASD może wystąpić wielkogłowie (makrocefalia) (Li, Wang, Guo, et al. 2017; Pirozzi, Nelson, and Mirzaa 2018).

Dzieci są diagnozowane na podstawie występowania powyższych symptomów, wywiadu rodzinnego oraz analiz genetycznych, co następuje najczęściej pomiędzy 2 a 4 rokiem życia (Christensen et al. 2019). Każdej wizycie kontrolnej towarzyszy dokładna ocena funkcji intelektualnych i językowych dziecka. Skuteczność diagnostyczna w grupie tych zaburzeń zależy w dużym stopniu od wiedzy i umiejętności lekarzy specjalistów sprawujących opiekę nad dziećmi autystycznymi, w tym genetyków klinicznych. Świadomość społeczeństwa oraz lekarzy na temat ASD jest coraz większa, co zwykle prowadzi do wcześniejszej diagnozy. Na przykład według zaleceń Amerykańskiej Akademii Pediatrii obecnie dąży się do rozpoznania pierwszych symptomów ASD już podczas rutynowych wizyt lekarskich w wieku 18 i 24 miesięcy życia dziecka, żeby zwiększyć wykrywalność ASD przed osiągnięciem przez dziecko 3-go roku życia (Johnson, Myers, and American Academy of Pediatrics Council on Children With 2007). Strategia ta dąży do jak najwcześniejszego rozpoznania zaburzeń i uwzględnienia

specjalnych potrzeb dziecka by zminimalizować starty jakie może przynieść czas bez diagnozy i terapii.

1.6.3. Klasyfikacja zaburzeń ze spektrum autyzmu

Obecnie w psychiatrii obowiązują dwie klasyfikacje rozpoznania ASD: ICD-11 (ang. International Classification of Diseases – version 11) przygotowana przez Światową Organizację Zdrowia oraz DSM-5 (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – version 5) wprowadzona przez Amerykańskie Towarzystwo Psychiatryczne. Profesjonaliści w Polsce korzystają głównie z klasyfikacji ICD-10, która zalicza autyzm do kategorii całościowych zaburzeń rozwoju (F84), w której wyodrębnia się następnie podkategorie jak np. autyzm wczesnodziecięcy, autyzm atypowy, zespół Retta, zespół Aspergera, dziecięce zaburzenia dezintegracyjne, zaburzenie hiperkinetyczne z towarzyszącym upośledzeniem umysłowym i ruchami stereotypowymi, inne całościowe zaburzenia rozwojowe oraz nieokreślone całościowe zaburzenia rozwojowe. Z kolei klasyfikacja DSM-5 nie wymienia poszczególnych rodzajów autyzmu zastępując je ogólnym terminem „zaburzenia ze spektrum autyzmu” i kładąc nacisk na intensywność obserwowanych zaburzeń i zapotrzebowanie na wsparcie (w skali L1 do L3) zamiast ich klasyfikację (The 2019; Moller 2018).

1.6.4. Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu

Zaburzenia ze spektrum autyzmu zostały po raz pierwszy opisane przez amerykańskiego dziecięcego psychiatrę Leo Kanner w 1943 roku, który opisał 11 dzieci z „autystycznymi zaburzeniami afektywnego kontaktu i obsesyjnym pragnieniem tej samej aktywności” (Kanner 1968). Pomimo nieustannych badań, mechanizm powstawania ASD pozostaje w dużej mierze nieznany, ale wiadomo, że w etiologii tych zaburzeń istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne, środowiskowe oraz interakcja dwóch powyższych (Bourgeron 2016). Prawdopodobieństwo wystąpienia tych zaburzeń u rodzeństwa wynosi średnio 4,5%, podczas gdy współczynnik zgodności dla bliźniąt jednojajowych jest większy niż 50%, a czasem sięga nawet 90%, co potwierdza wysoki stopień dziedziczenia ASD (Keller and Persico 2003; Bailey et al. 1995). Jednakże tylko u 10–30% osób z ASD udaje się ustalić przyczynę genetyczną, a u 70–90% dzieci przyczyny ASD pozostają nieznane (Wozniak et al. 2017; Muhle, Trentacoste, and Rapin

2004). Niemniej jednak, odkrycie genetycznych przyczyn ASD i badanie ścieżek, w których uczestniczą te geny znacznie poszerzyło wiedzę na temat molekularnych mechanizmów kluczowych dla rozwoju poznawczego i społecznego (Sztainberg and Zoghbi 2016).

1.6.5. Syndromiczne zaburzenia ze spektrum autyzmu

Nazwa choroby	Gen	Współwystępowanie z ASD	Mowa	Niepelnosprawność intelektualna
Zespół łamliwego chromosomu X	<i>FMR1</i>	30-60% (tylko płęć męska)	Opóźniona	Umiarkowana
Zespół Retta	<i>MECP2</i>	61% (tylko płęć żeńska)	Ograniczona lub brak	Umiarkowana lub poważna
Duplikacja genu Mecp2	<i>MECP2</i>	>90% (tylko płęć męska)	Ograniczona lub brak	Poważna lub głęboka
Zespół Angelmana	<i>UBE3A</i>	34%	Ograniczona lub brak	Poważna lub głęboka
Stwardnienie guzowate	<i>TSC1</i> lub <i>TSC2</i>	36-50%	Brak lub w normie	Łagoda lub poważna u 50%
Zespół delecji 22q13.3, zespół Phelana i McDermida	<i>SHANK3</i>	75%	Brak lub opóźniona	Umiarkowana lub głęboka
Zespół Timothy'ego	<i>CACNA1c</i>	60%	Poważnie opóźniona	Łagoda do umiarkowanej
Neurofibromat oza typu 1	<i>NF1</i>	18%	Opóźniona	Łagoda
Zespół makrocefalii związany z genem <i>PTEN</i>	<i>PTEN</i>	25%	Opóźniona	Umiarkowana
Autyzm idiopatyczny	-	100%	Opóźniona lub brak	Łagoda lub poważna u 50%

Tabela 1. Autyzm syndromiczny – choroby współwystępujące z ASD oraz ich wybrane cechy kliniczne. Na podstawie (Sztainberg and Zoghbi 2016).

Gdy zaburzenia ze spektrum autyzmu współwystępują ze znanymi chorobami spowodowanymi nieprawidłowościami chromosomalnymi lub mutacjami w pojedynczym genie określamy je mianem autyzmu syndromicznego (Sztainberg and

Zoghbi 2016). Tak jest w przypadku zespołu łamliwego chromosomu X czy zespołu Retta (Auerbach, Osterweil, and Bear 2011). Częstość współwystępowania tych oraz innych chorób z ASD oraz ich wybrane cechy kliniczne podsumowuje tabela 1. Żeby ustalić lub wykluczyć genetyczną przyczynę ASD należy wykonać analizę molekularną DNA w kierunku obecności mutacji, połączoną z wywiadem w kierunku niepełnosprawności intelektualnej w rodzinie, najlepiej z wykonaniem szczegółowej analizy rodowodu.

1.6.6. Niesyndromiczne zaburzenia ze spektrum autyzmu

Niesyndromiczne zaburzenia ze spektrum autyzmu, znane również pod nazwą „autyzm idiopatyczny” zwykle odnoszą się do „klasycznego autyzmu” opisanego przez Kanner, bez współistnienia innych chorób genetycznych. W tym przypadku nie wykryto jednoznacznej przyczyny, ale ze względu na potwierdzoną komponentę genetyczną w etiologii autyzmu wciąż poszukuje się zmian w genomie, które korelują z występowaniem ASD (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics 2013). W tym celu używa się badań asocjacyjnych całego genomu (ang. genome-wide association studies, GWAS), porównawczej hybrydyzacji genomowej (ang. comparative genomic hybridization, CGH) oraz metody sekwencjonowania całego genomu (ang. whole exome sequencing, WES) umożliwiającej identyfikację genów z rzadkimi mutacjami pojedynczego nukleotydu, które powstają *de novo* (RK et al. 2017; Sanders et al. 2012; Grove et al. 2019). Metodą CHG zidentyfikowano m.in. duplikacje i delecje fragmentów DNA na chromosomach: 15q11–13, 16p11.2, 22q11.2 i 7q11.23 występujące zarówno w zaburzeniach ze spektrum autyzmu syndromicznych jak i niesyndromicznych (Sebat et al. 2007). Uzyskane w badaniach dane gromadzone są w ogólnodostępnych bazach danych: SFARI Gene (<https://gene.sfari.org/>) prowadzoną przez Simon Foundation (Abrahams et al. 2013) oraz AutismKb (<http://autismkb.cbi.pku.edu.cn/>) prowadzoną przez Uniwersytet w Pekinie (Yang et al. 2018). W zestawieniu geny klasyfikowane są na podstawie siły korelacji z występowaniem ASD.

Neuroliginy są pierwszymi genami, w których wykryto mutacje pojedynczego nukleotydu i powiązano je z niesyndromicznym ASD na podstawie badań genetycznych u ludzi, a następnie na mysich modelach (Cao and Tabuchi 2017). Neuroliginy i neureksyny należą do nielicznych rodzin białek, z których wszystkie izoformy są wymienione w bazie danych SFARI (Tabela 2). Poza tymi genami, udowodniono

dotychczas udział m.in. następujących genów w etiologii ASD: *Syngap1*, *Cntns*, *Cntnap2*, *Scn2A*, *Dyrk1A* i *Chd8* (Sztainberg and Zoghbi 2016; Yasin et al. 2019). Ich główne funkcje w komórkach nerwowych przedstawia zbiorczo tabela 3.

Nazwa genu	Nazwa białka	Chromosom	Klasyfikacja SFARI	Klasyfikacja AutismKb
<i>Nlgn1</i>	Neurolegina 1	3q26.31	4	13
<i>Nlgn2</i>	Neurolegina 2	17p13.1	bd	3
<i>Nlgn3</i>	Neurolegina 3	Xq13.1	2	26
<i>Nlgn4X</i>	Neurolegina 4X	Xp22.32- p22.31	3	38
<i>Nlgn4Y</i>	Neurolegina 4Y	Yq11.221	4	12
<i>Nrxn1</i>	Neureksyna 1	2p16.3	2	28
<i>Nrxn2</i>	Neureksyna 2	11q13.1	4	16
<i>Nrxn3</i>	Neureksyna 3	14q24.3-q31.1	3	3

Tabela 2. Klasyfikacja genów neurolegin i neureksyn na podstawie siły korelacji z występowaniem ASD u ludzi według baz danych SFARI i AutismKb. Klasyfikacja SFARI: 1 – bardzo silna korelacja; 2 – silna korelacja; 3 – sugestywna korelacja; 4 – minimalna korelacja; bd – brak danych. Klasyfikacja AutismKb: im wyższa liczba tym silniejsza korelacja. Na podstawie (Cao and Tabuchi 2017).

Gen związany z ASD	Nazwa	Funkcja	Referencje
<i>Syngap1</i>	Synaptyczne białko aktywujące GTPazę Ras (synaptic Ras GTPase activating protein 1)	Reguluje pracę kluczowego neuronalnego enzymu – GTPazy Ras; kotwicy receptory AMPA w błonie, wpływa na zależną od receptora NMDA plastyczność i funkcje synapsy oraz rozwój poznawczy	(Berryer et al. 2013)
<i>Cntn4-6</i>	Kontaktyna 4-6 (contactin 4-6)	Strukturalna, adhezyjna, pre- i postsynaptyczne białko adhezji komórkowej, udział w utrzymaniu synapsy	(Mercati, 2017 #141)
<i>Cntnap2</i>	Białko oddziałujące z kontaktyną 2 (contactin-associated protein-like 2)	Strukturalna, adhezyjna, należy do rodziny neureksyn, udział w lokalnym różnicowaniu aksonu na odrębne funkcjonalne domeny, oddziałuje z CNTN2	(Sampath et al. 2013)
<i>Scn2A</i>	Podjednostka α zależnego od napięcia kanału sodowego typu II (sodium channel voltage-gated type II α subunit, $Na_v\alpha 1.2$)	Funkcjonalna podjednostka ważnego kanału sodowego, udział w generowaniu i propagacji potencjału czynnościowego w neuronach i mięśniach)	(Kruth et al. 2020)
<i>Dyrk1A</i>	Kinaza 1A o podwójnej specyficzności regulowana fosforylacją tyrozyny (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A)	Enzym katalizujący autofosforylację Ser/Thr i Tyr, reguluje poziom homocysteiny, proliferację komórek oraz procesy uczenia się	(O'Roak et al. 2012)
<i>Chd8</i>	Helikaza wiążąca DNA o charakterze chromodomeny 8 (chromodomain helicase DNA binding protein 8)	Enzym kompleksu remodelującego chromatynę NuRD hydrolizujący ATP do ADP, kluczowy podczas rozwoju zarodkowego	(Bernier et al. 2014)

Tabela 3. Nazwy i funkcje wybranych genów, w których zmiany genetyczne korelują z wystąpieniem zaburzeń ze spektrum autyzmu.

1.6.7. Poszukiwanie przyczyn zaburzeń ze spektrum autyzmu

Obecnie uważa się, że główną przyczyną obserwowanych deficytów behawioralnych oraz poznawczych w ASD jest zaburzenie homeostazy neuronalnej (Louros and Osterweil 2016) prowadzące do zmniejszonej plastyczności synapsy, nieprawidłowości w przewodnictwie nerwowym oraz dysfunkcji całego obwodowego układu nerwowego (Ramocki and Zoghbi 2008). Jako bezpośrednie przyczyny tego stanu wymienia się: brak równowagi pomiędzy pobudzeniem i hamowaniem w synapsach (Nelson and Valakh 2015), deficyty w regulacji transkrypcji (Chahrour et al. 2008) i/lub translacji (Kelleher and Bear 2008), zaburzenia w ekspresji genów zależne od aktywności synaptycznej (Ebert and Greenberg 2013) lub nieprawidłowości w komórkach glejowych (Zhan et al. 2014). Badania wykazują, że funkcje synaptyczne są poważnie zaburzone nawet w wyniku subtelnych zmian w ilości białek neuronalnych, w tym organizujących synapsę takich jak neuroliginy i neureksyny (Mackowiak, Mordalska, and Wedzony 2014). Niemniej jednak podłoże molekularne tego stanu jest wciąż poddawane analizom. By wykryć biologiczne funkcje i szlaki molekularne, w jakich uczestniczą zidentyfikowane geny *in vivo* zazwyczaj używa się modeli zwierzęcych, do których wprowadza się pojedyncze mutacje zdiagnozowane u ludzi (Verma et al. 2019).

Co ciekawe, niedawno ukazały się badania udowadniające, że oś mózg-jelito przyczynia się do patofizjologii ASD, co sugerowano już od jakiegoś czasu (Sharon et al. 2019). Flora bakterii jelitowych osób z ASD różni się od osób o typowym wzorcu zachowań. Badacze wykryli, że w mózgu zdrowych myszy z bakteriami jelitowymi przeszczepionymi od osoby z ASD zachodzi alternatywne składanie pięćdziesięciu dwóch genów związanych z autyzmem wymienionych w bazie danych SFARI (<http://gene.sfari.org>), np. takich jak *Fmr1*, *Nrxn1* czy *Nrxn2*. Ponadto, podawanie określonych metabolitów bakterii jelitowych myszom z ASD częściowo redukuje ich autystyczne zachowania oraz moduluje pobudzenie neuronalne w mózgu myszy (Sharon et al. 2019).

1.6.8. Strategie terapeutyczne w zaburzeniach ze spektrum autyzmu

Czy istnieje lek na zaburzenia ze spektrum autyzmu? - pytają rodzice dzieci z ASD. W świetle aktualnej wiedzy naukowej niestety nie. Autyzmu nie da się wyleczyć,

ponieważ nie jest to choroba tylko wzorzec rozwojowy odmienny od wzorca neurotypowego występującego najczęściej w populacji (Pajareya and Nopmaneejumruslers 2011). Proponowane są różne terapie, ale przede wszystkim trzeba zaakceptować fakt występowania ASD i nauczyć się z nim żyć. Rodzice i otoczenie powinno świadomie i mądrze wspierać rozwój dziecka z ASD, by zmniejszać natężenie objawów oraz zapobiegać wtórnym konsekwencjom, takim jak poważne zaburzenia emocjonalne czy niepełnosprawność intelektualna (Anderson 2019).

Wśród obecnie stosowanych strategii terapeutycznych stosuje się podejście behawioralne i rozwojowe, które różnią się ideą oraz stylem pracy. W zależności od stopnia nasilenia objawów proponuje się następujące terapie: metodę 3i (intensywna – indywidualna – interaktywna), metodę ESDM (ang. early start Denver model), metodę opcji (ang. son – rise), model DIR/Floortime (ang. developmental individual differences relationship), metodę rozwoju relacji (ang. reationship development intervention, RDI), metodę stosowanej analizy zachowania, kompleksowy program terapii TEACCH (treatment and education of autistic and related communication handicapped children) oraz terapie logopedyczne i pedagogiczne. Tę listę uzupełniają metody wspierające takie jak: komunikacja wspierająca i alternatywna (ang. Augmentative and Alternative Communication, AAC), integracja sensoryczna, metoda dobrego startu, metoda symultaniczno-sekwencyjna, biofeedback, arteterapia, logorytmika, muzykoterapia czy metody nazwane od nazwisk ich twórców takie jak: metoda Weroniki Sherborne, metoda aktywności Knillów, metoda Thomatisa oraz gimnastyka mózgu Dennisona. Czasem uzupełnieniem terapii może być czas spędzony na interakcji z psami (dogoterapia) czy końmi (hipoterapia) (Masi et al. 2017; DeFilippis and Wagner 2016).

Każda z proponowanych strategii jest weryfikowana przez amerykańską organizację National Autism Center oceniającą skuteczność różnych form terapii (www.nationalautismcenter.org). Niemniej jednak nowo opracowywane metody często nie mają jeszcze wystarczająco udowodnionej naukowo skuteczności terapeutycznej. W rezultacie najczęściej rodzina łączy kilka metod by uzyskać optymalne rezultaty odpowiadające indywidualnym potrzebom osób z ASD (Sharma, Gonda, and Tarazi 2018).

Przykładowo, metoda DIR/Floortime to model rozwojowy uwzględniający indywidualne różnice oparty na budowaniu relacji z innymi ludźmi stworzoną przez

wybitnego amerykańskiego psychiatrę Stanleya Greenspana (Wieder and Greenspan 2003). Metoda ta opiera się na wiedzy na temat wczesnego rozwoju dziecka i zakłada nabywanie przez dzieci z ASD umiejętności z kolejnych 6 poziomów rozwoju społecznego, które zostały pominięte lub opanowane tylko częściowo (Pajareya and Nopmaneejumrulers 2011). Głównym celem tej terapii nie jest zmiana zachowań, lecz ukształtowanie elastyczności i samodzielności w komunikacji, myśleniu oraz interakcjach społecznych (Wieder and Greenspan 2003). Pomimo braku rzetelnych badań potwierdzających skuteczność tej interwencji model DIR/Floortime jest chętnie wykorzystywany przez terapeutów, którym bliskie jest podejście rozwojowe, również w Polsce.

Farmakoterapia stosowana jest tylko w przypadku zaburzeń współwystępujących i utrzymujących się zachowaniach tzw. „trudnych” (DeFilippis and Wagner 2016). Co ciekawe, niedawno przeprowadzone 12-miesięczne badania kliniczne wykazały, że dobrze zbilansowana dieta połączona z suplementacją witamin i minerałów wpływa na poprawę ilorazu inteligencji oraz redukcję zachowań autystycznych u osób z ASD (Adams et al. 2018).

1.7. Zespół łamliwego chromosomu X - model syndromicznego autyzmu

Jednym z najlepiej zbadanych i zrozumianych na poziomie molekularnym genetycznych modeli zaburzeń ze spektrum autyzmu jest zespół łamliwego chromosomu X (ang. fragile X syndrome, FXS). FXS jest drugą po zespole Downa najczęstszą przyczyną niepełnosprawności intelektualnej na świecie. Charakteryzuje się obniżeniem poziomu intelektualnego różnego stopnia oraz objawami typowymi dla zaburzeń ze spektrum autyzmu (Saldarriaga et al. 2014). Choroba została pierwotnie opisana przez brytyjskich lekarzy Martin’a i Bell’a w roku 1943 (Martin and Bell 1943). Gdy choroba współwystępuje z zaburzeniami ze spektrum autyzmu określamy ją jako autyzm syndromiczny (Sztainberg and Zoghbi 2016). Szacuje się, że osoby z FXS stanowią 1-5% wszystkich przypadków ASD, a około 60% z nich spełnia kryteria ASD wg klasyfikacji DSM-4 (Kelleher and Bear 2008). FXS występuje w populacji z częstotliwością 1/4000 u mężczyzn i 1/8000 u kobiet (Bagni et al. 2012).

1.7.1. Objawy kliniczne zespołu łamliwego chromosomu X

Klinicznie, zespół łamliwego chromosomu X jest chorobą o szerokim spektrum objawów (Hagerman et al. 2012), do których zalicza się łagodny do poważnego stopień niepełnosprawności intelektualnej oraz zachowania autystyczne, często na przemian z zespołem nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD). Chorzy mają problemy z adaptacją społeczną, ponieważ wykazują lęk przed życiem społecznym (różnego stopnia). Dodatkowo mogą wykazywać zaburzenia w myśleniu abstrakcyjnym, zdolności do koncentracji, pamięci krótkotrwałej, a także tendencję do stanów lękowych, obsesji, zaburzeń snu czy napadów (auto)agresji (Saldarriaga et al. 2014).

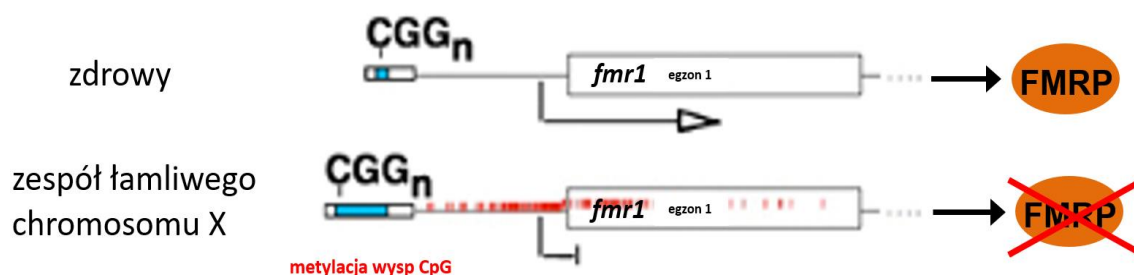
Objawy charakterystyczne dla FXS znacznie pogarszają jakość życia pacjentów poprzez obniżenie ich zdolności do funkcjonowania w społeczeństwie. U mężczyzn przebieg choroby jest cięższy, zaś kobiety często są bezobjawowymi nosicielkami mutacji. Szacuje się, że nawet około 90% mężczyzn cierpiących na FXS ma objawy charakterystyczne dla spektrum autyzmu np. powtarzalność zachowań oraz zaburzenia w interakcjach społecznych i rozwoju mowy (Hernandez et al. 2009; McNaughton et al. 2008).

Poza wymienionymi zaburzeniami, około 60% chorych ma charakterystyczne cechy wyglądu zewnętrznego takie jak: podłużna twarz, duże odstające uszy, wypukłe czoło czy występujący u chłopców makroorchydyzm (Bassell and Warren 2008; Saldarriaga et al. 2014). Dodatkowo, mogą wystąpić problemy kardiologiczne i napady padaczkowe, z czego ostatnie pojawiają się u około 15% chorych (Sabaratnam, Vroegop, and Gangadharan 2001). Co istotne, długość życia chorych na zespół łamliwego chromosomu X nie odbiega od średniej długości życia osoby zdrowej.

1.7.2. Etiologia i diagnostyka zespołu łamliwego chromosomu X

FXS ma podłoże genetyczne i jest chorobą monogenową, czyli spowodowaną mutacją w jednym genie. Gen *fmr1* jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu X. Zamiennie używana nazwa „zespół kruchego chromosomu X” wywodzi się z faktu, że podczas badania kariotypu ten chromosom od pacjentów z mutacją często pęka w charakterystycznym miejscu, gdzie następuje przewężenie (Harrison et al. 1983).

Bezpośrednią przyczyną choroby jest dynamiczna mutacja w genie *fmr1* (Verkerk et al. 1991) skutkująca nadmierną amplifikacją trójki nukleotydów o sekwencji CGG w rejonie 5' UTR (nieulegającym translacji) genu *fmr1* (ponad 200 powtórzeń). Powoduje to hipermetylację tego fragmentu DNA, wyciszenie ekspresji genu *fmr1* i w konsekwencji kompletny brak produkcji białka zespołu łamliwego chromosomu X zwanego FMRP (ang. fragile X mental retardation protein, FMRP), co ilustruje rycina 10. Przyczyna tej choroby została po raz pierwszy opisana w 1991 roku (Pieretti et al. 1991; Verkerk et al. 1991).



Rycina 10. Schemat przedstawiający zmiany zachodzące w obrębie genu *fmr1* u osoby z FXS.

U ludzi zdrowych liczba powtórzeń tripletu CGG wynosi pomiędzy 5 a 55, przy czym średnia liczba powtórzeń tej sekwencji wynosi 30 (Bagni and Oostra 2013). Ilość 55-200 powtórzeń CGG w genie *fmr1* skutkuje objawami zespołu drżenia i ataksji związanego z łamliwym chromosomem X (ang. Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome, FXTAS) (Garcia-Arocena and Hagerman 2010). Objawy tej osobnej jednostki chorobowej występują zazwyczaj dopiero po pięćdziesiątym roku życia, jednakże liczba powtórzeń CGG ma tendencję do powielania się w następnych pokoleniach. Przy obecności ponad 200 powtórzeń pojawiają się objawy zespołu FXS u wszystkich obciążonych nią chłopców (ze względu na obecność jednego chromosomu X) i u około połowy dziewczynek (Bagni and Oostra 2013). U niektórych kobiet choroba może przebiegać zupełnie bezobjawowo ze względu na obecność dwóch chromosomów X oraz inaktywację jednego z nich (Bagni et al. 2012).

Diagnoza następuje zazwyczaj około 3 roku życia ze względu na fakt opóźnienia lub braku rozwoju mowy, jak również nietypowe zachowanie dziecka (Bailey et al 2009). Najistotniejsze markery diagnostyczne FXS to wywiad rodzinny w kierunku niepełnosprawności intelektualnej, zachowań autystycznych oraz charakterystyczne cechy dysmorfii twarzy towarzyszącej temu zespołowi. Wiele objawów behawioralnych

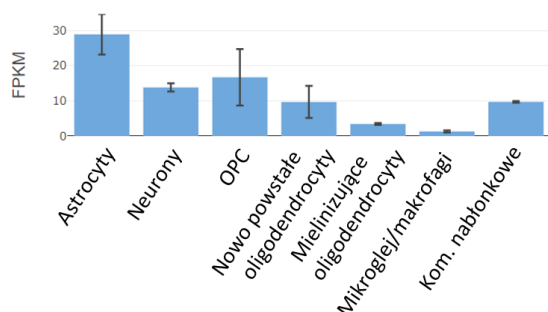
choroby pokrywa się z klasycznym autyzmem (Dissanayake et al. 2009), chociaż niektórzy badacze wskazują na nieco odmienny profil zachowań jak np. częstsze występowanie powtarzających się zachowań, mniej poważne zachowania kompulsywne czy zmniejszone zaburzenie interakcji socjalnych w przypadku FXS (Smith et al. 2012; Wolff et al. 2012). Żeby ustalić przyczynę tej choroby należy wykonać diagnostykę genetyczną w kierunku obecności dynamicznej mutacji w genie *fmr1*. W tym przypadku szczególnie ważny jest wywiad rodzinny sugerujący FXS i/lub niepełnosprawność intelektualną u krewnych płci męskiej oraz wykonanie analizy rodowodu (Harris et al. 2008; Goodlin-Jones et al. 2004).

1.8. Charakterystyka białka zespołu łamliwego chromosomu X (FMRP)

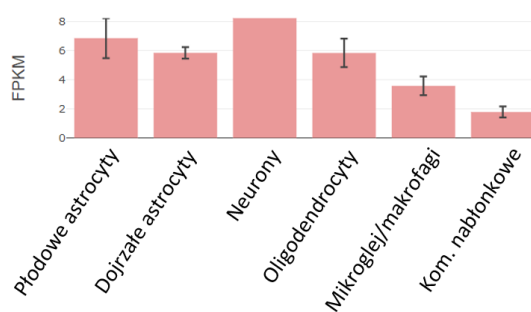
1.8.1. Ekspresja białka FMRP w komórkach mózgu

FMRP jest białkiem ulegającym silnej ekspresji w komórkach nerwowych, zarówno w ciele komórki i jądrze komórkowym, dendrytach jak i aksonach (Zalfa and Bagni 2005; Christie et al. 2009). Jak pokazano na rycinie 11 obecność transkryptu *Fmr1* wykazano też w astrocytach, komórkach prekursorowych oligodendrocytów, oligodendrocytach, mikrogleju oraz komórkach nabłonkowych zarówno u ludzi (Zhang et al. 2016), jak i u myszy (Zhang et al. 2014). W wyniku alternatywnego składowania mRNA powstaje nawet do dwudziestu wariantów białka FMRP (Sittler et al. 1996). Białko FMRP izolowane z ludzkiego i mysiego mózgu posiada masę cząsteczkową 67-80 kDa (Verheij et al. 1995).

Fmr1 - Mus musculus



FMR1 - Homo sapiens

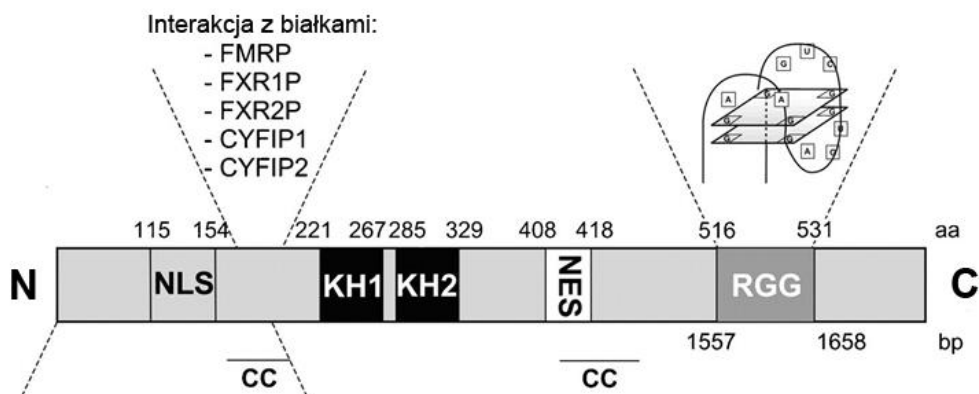


Rycina 11. Poziom ekspresji transkryptu *Fmr1* w poszczególnych komórkach uzyskanych z kory mózgowej myszy (P7) i człowieka (płat skroniowy, 8-63 lata) zmierzony za pomocą metody sekwencjonowania RNA. OPC – komórki prekursorowe oligodendrocytów; FPKM – ilość zsekwencjonowanych fragmentów na kilobazę

sekwencji transkryptu na milion zmapowanych fragmentów. Na podstawie bazy danych http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html (Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2016).

1.8.2. Struktura białka FMRP i wiązanie RNA

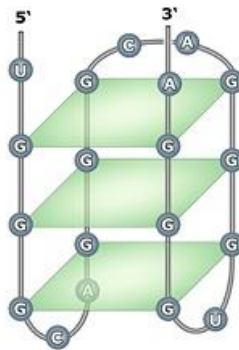
Białko FMRP ma domenową budowę (Rycina 12) i znana jest jego budowa krystaliczna (Vasilyev et al. 2015). Obecnie wiadomo, że białko FMRP w swojej strukturze posiada przynajmniej cztery domeny wiążące RNA: N-końcowy motyw NDF (ang. N-terminal domain of FMRP), domeny KH1 i KH2 (ang. K homology domain 1/2) oraz RGG box (ang. arginine, glycine, glycine) zlokalizowany na C-końcu (Vasilyev et al. 2015; Sittler et al. 1996; Adinolfi et al. 2003). Na N-końcu białko FMRP posiada też sygnał eksportu jądrowego (ang. nuclear export signal, NES), a pomiędzy domenami KH1/2 oraz RGG box sygnał lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal, NLS), co umożliwia dwukierunkowy transport tego białka pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą (Eberhart et al. 1996).



Rycina 12. Schemat przedstawiający domeny białka FMRP. Od końca aminowego: sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), rejon odpowiedzialny za dimeryzację FMRP oraz interakcję z białkami FXR1/2P i CYFIP1/2, domeny KH1 i KH2, sygnał eksportu jądrowego (NES), domena RGG box, która wiąże sekwencje bogate w guaninę w mRNA. Na podstawie (D'Hulst and Kooy 2009).

Pierwsze 134 aminokwasy tworzą motyw NDF, który zawiera dwa powtórzenia motywu Tudor, dwa powtórzenia motywu Agenet, sporo struktur β -kartki oraz krótką α -helisę (Adinolfi et al. 2003). Ten region odpowiedzialny jest za dimeryzację FMRP z samym sobą lub z homologami tego białka – FXR1P i FXR2P. W tym regionie dochodzi

również do oddziaływania z białkami CYFIP1/2 (Schenck et al. 2001). Domeny KH1/2 wiążą się do pseudowęzłów pętla-pętla, czyli trójwymiarowych struktur RNA określanych jako „kissing complex” lub „kissing loop” w obrębie struktury szpilki do włosów (ang. hairpin) (Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005). Region ten odpowiada za wiązanie FMRP z polirybosomami. Wiązanie RNA przez domenę KH jest zależne od dwuwartościowych jonów magnezu (Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005). Większość oddziaływań białka FMRP z docelowym RNA odbywa się pomiędzy bogatą w powtórzenia Arg-Gly-Gly domeną RGG box w FMRP i sekwencją bogatą w guaninę (G) w transkrypcie, z którym oddziałuje białko FMRP (Ramos, Hollingworth, and Pastore 2003; Darnell et al. 2001). Drugorzędowa struktura RNA tworzona przez sekwencję bogatą w G zwana jest G-kwartetem lub G-kwadrupleksem (Rycina 13).



Rycina 13. Przykładowa struktura G-kwartetu tworzona przez sekwencje mRNA bogate w guaninę.

Struktura G-kwartetu jest niezwykle stabilna i podąża za wzorem $(U/A \underline{GG} X_{0-4})_4$, gdzie X oznacza dowolną zasadę azotową (Darnell, Warren, and Darnell 2004). Wiązanie RNA przez domenę RGG nie wymaga obecności jonów magnezu (Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005). Poza powinowactwem do struktur „kissing complex” i G-kwartetów białko FMRP może wiązać się do sekwencji bogatych w urydynę (Denman 2003) oraz do ogona poli(A), co udowodniono *in vitro* (Corbin et al. 1997). Wykazano, że sekwencje bogate w G zdolne do utworzenia struktury G-kwartetu, poza wiązaniem białka FMRP mają znaczenie w wielu innych procesach biologicznych, takich jak: stabilność mRNA, zatrzymywanie transkrypcji, inicjacja translacji i hamowanie translacji (Darnell et al. 2001).

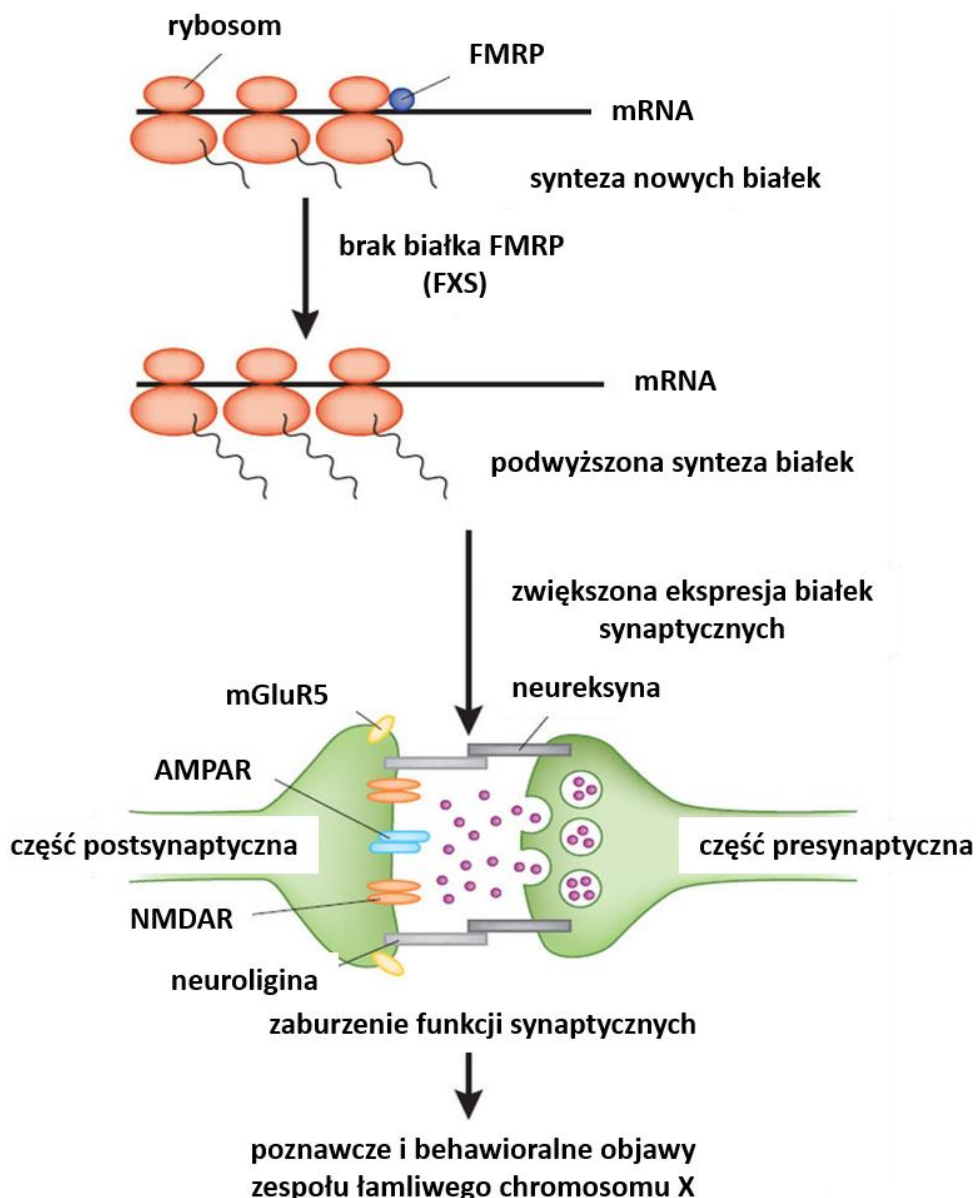
Analiza regionów sekwencji RNA, z którymi oddziałuje białko FMRP wykazała, że FMRP może się wiązać zarówno do regionu 5' UTR, sekwencji kodującej jak i sekwencji 3' UTR docelowego transkryptu (Darnell et al. 2011), choć prawdopodobnie najczęściej wiąże się do sekwencji regulatorowych RNA, które mogą tworzyć struktury drugorzędowe w RNA np. szpilki do włosów (ang. hairpins), pętle (ang. stem-loops) lub G-kwartety (Jung et al. 2014). Wykazano, że najkrótsza długość sekwencji RNA zdolnej do związania z białkiem FMRP wynosi 45 nukleotydów (Ascano et al. 2012). Powyższe dane wskazują, że mechanizm wiązania mRNA przez białko FMRP jest niezwykle złożony.

1.8.3. Funkcje białka FMRP

Białko FMRP jest konieczne do prawidłowego rozwoju i funkcji układu nerwowego zarówno w fazie prenatalnej oraz postnatalnej (Darnell et al. 2011). Większość białek FMRP (około 90%) jest związana z polirybosomami, co sugeruje jego rolę w translacji białek (Feng, Absher, et al. 1997; Khandjian et al. 2004; Stefani et al. 2004). W neuronach mRNA kodujące białka synaptyczne transportowane są z ciała neuronu w kierunku synaps w granulach rybonukleoproteinowych (ang. ribonucleoprotein particle, RNP). Białko FMRP wiąże się z transportowanymi w granulach mRNA pośrednio wpływając na ich wewnątrzkomórkowy transport oraz stabilność (Darnell et al. 2011). Jednak podstawową funkcją FMRP w neuronach jest wiązanie mRNA i regulacja procesu lokalnej translacji mRNA w synapsie (Zalfa and Bagni 2005; Weiler et al. 1997). Poza przejściową represją translacji FMRP ma też aktywność białka opiekuńczego (chaperona) (Gabus et al. 2004). Dzięki temu FMRP może modyfikować fałdowanie kwasów nukleinowych do ich najbardziej stabilnej struktury bez udziału energii w postaci ATP, w ten sposób zapewniając najkorzystniejsze konformacje pod względem kinetycznym (Rein, Henderson, and Levin 1998).

Udowodniono, że tymczasowe hamowanie syntezy białek przez FMRP odbywa się poprzez zatrzymanie translacji rybosomów na mRNA podczas translacji (Darnell et al. 2011). W wyniku pobudzenia neuronalnego białko FMRP ulega defosforylacji, oddysocjuje z polirybosomów i umożliwia syntezę białek (Darnell et al. 2011). Ten proces jest kluczowy, ponieważ synteza białek jest konieczna do długotrwałej plastyczności synaptycznej (Klann and Dever 2004), czyli zjawiska leżącego u podstaw

uczenia się i zapamiętywania (Malenka and Bear 2004). Istotę pełnionej przez FMRP funkcji podkreśla fakt, iż mutacja białka FMRP w drugiej domenie wiążącej RNA (I304N) powoduje brak asocjacji FMRP z polirybosomami (Zang et al. 2009; Feng, Absher, et al. 1997), a w konsekwencji fenotyp FXS u myszy (Zang et al. 2009) i ludzi (De Boule et al. 1993). Zespół łamliwego chromosomu X jest pierwszą chorobą genetyczną, dzięki której powiązано regulację RNA z funkcjami poznawczymi człowieka.



Rycina 14. Schemat ilustrujący zatrzymywanie rybosomu przez białko FMRP podczas translacji, co prowadzi do podwyższonej ekspresji białek i zaburzenia funkcji synaptycznych w zespole łamliwego chromosomu X. Na podstawie (Ting and Feng 2011).

Jak pokazano na rycinie 14, brak inhibicji translacji przez FMRP prowadzi do podwyższonej ekspresji wielu ważnych synaptycznych białek kluczowych dla funkcjonowania neuronów, prawidłowego przebiegu synaptycznego i plastyczności synaptycznej (Muddashetty et al. 2007). Próby identyfikacji RNA, z którymi oddziałuje białko FMRP w mysim mózgu podjęto w 2001 roku wykorzystując metodę współwytrącania RNA z białkiem FMRP i mikromacierze (RIP-CHIP) (Brown et al. 2001). W wyniku tych badań odkryto 432 RNA, których syntezę reguluje białko FMRP. Co więcej, na podstawie analiz profilu polirybosomów ustalono, że 251 transkryptów ma zaburzony proces translacji w przypadku braku FMRP, co potwierdziło udział białka FMRP w regulacji translacji (Brown et al. 2001). Dokładniejsze badania przeprowadzono z wykorzystaniem metody immunoprecypitacji po sieciowaniu UV połączonej z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem RNA (high throughput sequencing of RNAs isolated by crosslinking immunoprecipitation, HITS-CLIP) (Darnell et al. 2011) służącej do identyfikacji interakcji RNA i białek *in vivo* wykorzystując promieniowanie UV, które penetruje do komórki i tworzy kowalentne wiązanie pomiędzy białkami i RNA, które są w ścisłym kontakcie (Darnell 2010; Licatalosi et al. 2008; Ule et al. 2003). W tym badaniu udowodniono, że białko FMRP oddziałuje z 842 transkryptami w mysim mózgu (Darnell et al. 2011). Wśród nich można wymienić mRNA kodujące wiele białek synaptycznych: podjednostki alfa i beta kinazy typu II zależnej od wapnia i kalmoduliny (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha and beta, CAMK2A, CAMK2B), podjednostki 1, 2A i 2B jonotropowego receptora NMDA dla glutaminianu (GluN1, GluN2A, GluN2B), podjednostkę 4 i 5 metabotropowego receptora dla glutaminianu (glutamate receptor, metabotropic 4 and 5, GRM4, GRM5), podjednostki 3 i 5 kainianowego jonotropowego receptora dla glutaminianu (glutamate receptor, ionotropic, kainate 3 and 5, GRIK3, GRIK5) czy białko gęstości postsynaptycznej 95 (postsynaptic density protein 95, PSD-95) (wymienione w tabeli S2 w Darnell et al. 2011). FMRP reguluje też translację własnego transkryptu (Gabus et al. 2004).

Co więcej, w tym badaniu wykryto, że wśród RNA, z którymi oddziałuje FMRP jest 80 genów związanych z ASD według bazy danych SFARI (<http://gene.sfari.org>) (Banerjee-Basu and Packer 2010). Ten wynik sugeruje, że nieprawidłowe działanie FMRP może przyczyniać się do powstawania zaburzeń ASD. Na tej liście wymieniono

Nlgn3, a także *Nrxn1*, *Nrxn3*, *Shank3*, *Pten*, *Tsc2* i *Nf1* (wymienione w tabeli S5 w Darnell et al. 2011).

Brak FMRP skutkuje podwyższoną syntezą wielu białek synaptycznych w komórkach nerwowych (Bhakar, Dolen, and Bear 2012). Według teorii mGluR profesora Bear'a, w zespole łamliwego chromosomu X dochodzi między innymi do nadmiernej ekspresji i aktywności receptorów metabotropowych dla glutaminianu 5 (mGluR5) i wzmożonego mechanizmu długotrwałego osłabienia synaptycznego (ang. long-term depression, LTD) w synapsach w rejonie hipokampa (Bear, Huber, and Warren 2004).

1.9. Transport mRNA i lokalna translacja w dendrytach

Wiele transkryptów synaptycznych po transkrypcji w jądrze komórkowym neuronu nie ulega translacji w ciele komórki, lecz jest transportowana do wypustek dendrytycznych, gdzie ulega lokalnej syntezie w bezpośredniej bliskości synapsy w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne (Bramham and Wells 2007; Holt, Martin, and Schuman 2019; Hafner et al. 2019). Proces lokalnej translacji w synapsie jest dla neuronów kluczowy by szybko, lokalnie i precyzyjnie odpowiedzieć na stymulację synaptyczną (Sutton and Schuman 2006) i stanowi jeden z głównych mechanizmów w plastyczności synaptycznej (Biever, Donlin-Asp, and Schuman 2019).

Transport pojedynczego mRNA odbywa się w wyspecjalizowanych granulach rybonukleoproteinowych (ang. ribonucleoprotein particles, RNP), które stanowią kompleks złożony z białek i RNA (Kiebler and Bassell 2006). Granule przemieszczają się wzdłuż mikrotubul dzięki białkom motorycznym: dyneinie i kinezyinie. Co istotne, każda z tych mierzących około 100-250 nm granul transportuje tylko jedną cząsteczkę mRNA (Batish et al. 2012). Skład granul może się różnić, ale zidentyfikowano ponad 200 białek mogących wchodzić w ich skład. Wśród nich można wymienić: FMRP, FXR1P, FXR2P, Staufen1/2, helikazy, wiele białek wiążących RNA, czynniki transkrypcyjne i regulujące translację, heterogenne rybonukleoproteiny jądrowe (hnRNP) białka opiekuńcze (chaperonowe) i białka transportowe np. dynaktyna i tubulina (Elvira et al. 2006). Ważnym składnikiem granul są podjednostki 40s i 60s rybosomów. Choć nie poznano jeszcze w pełni mechanizmu rozpoznawania przez granule docelowej synapsy, postuluje się, że granule aktywnie poruszają się w obu kierunkach wzdłuż dendrytu zamiast zatrzymywać się w jednym miejscu. W wyniku aktywacji synaptycznej mRNA

jest kierowane do kolca dendrytycznego i synapsy, gdzie ulega lokalnej poliadenylacji i translacji (Doyle and Kiebler 2011). FMRP bierze udział zarówno w procesie transportu mRNA do synaps jak i translacji mRNA.

W synapsie znajduje się kompletna maszyna translacyjna. Obecność polirybosomów w synapsie zaobserwowano już w 1965 roku za pomocą mikroskopii elektronowej (Bodian 1965). W późniejszych badaniach w pierwotnej hodowli neuronalnej poza rybosomami zwiualizowano też tRNA oraz czynniki inicjacji i elongacji translacji (eIF2 i EF2) (Tiedge and Brosius 1996) oraz zademonstrowano znaczenie lokalnej translacji (Torre and Steward 1992; Kang and Schuman 1996).

W badaniach *in vitro* wykazano, że te polirybosomy przeprowadzają translację również w synaptoneurosomach, czyli preparacie wzbogaconym w synapsy zawierającym oderwane kolce dendrytyczne i zakończenia aksonów, które zachowują funkcje synaptyczne, w tym zdolność do aktywacji synaptycznej (Verity, Brown, and Cheung 1980; Gambetti et al. 1972). W dendrytach i aksonach hipokampa zidentyfikowano około 2,5 tysiąca transkryptów, co sugeruje, że bardzo wiele białek ulega zależnej od aktywności synaptycznej translacji w sąsiedztwie synapsy zamiast w ciele komórki nerwowej (Cajigas et al. 2012).

1.10. Badania nad molekularnym podłożem zespołu łamliwego chromosomu X

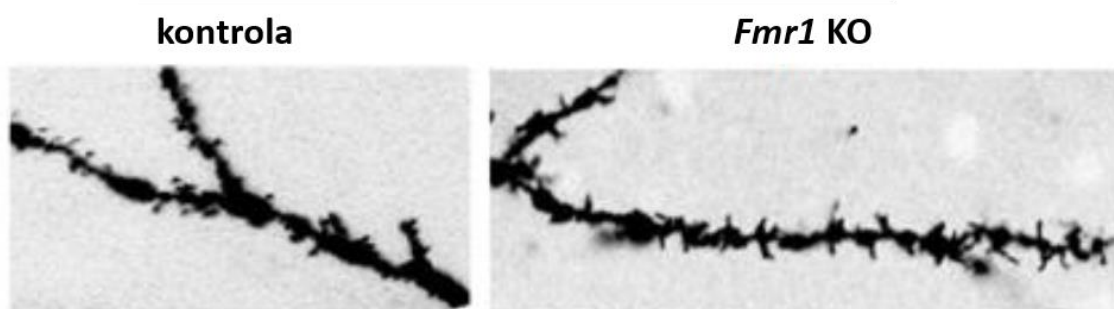
1.10.1. Myszy *Fmr1* KO - model zespołu łamliwego chromosomu X u ludzi

Badania na modelach zwierzęcych są głównym źródłem wiedzy na temat fizjologii funkcjonowania układu nerwowego oraz patologicznych zmian towarzyszących zaburzeniom ASD (Bey and Jiang 2014). Myszy pozbawione ekspresji genu *Fmr1* (*Fmr1* KO) są bardzo dobrze opisanym modelem badawczym rekapitulującym symptomy ludzkiego zespołu łamliwego chromosomu X (Leung and Jia 2016; Kazdoba et al. 2014; Krueger et al. 2011). Linia tych myszy powstała w roku 1994 dzięki pracom niderlandzko-belgijskiego konsorcjum ('*Fmr1* knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium' 1994), a badania z ich użyciem pozwalają lepiej zrozumieć zmiany zachodzące podczas tej choroby. Wszystkie obecnie dostępne linie myszy *Fmr1* KO wykazują zachowania charakterystyczne dla FXS, co zostało udowodnione w testach behawioralnych analizujących m.in. ich zachowania społeczne, pobudliwość oraz skłonność do stanów lękowych, powtarzalnych

zachowań oraz samookaleczania (Ding, Sethna, and Wang 2014). Gen *Fmr1* jest zachowany w ewolucji pomiędzy gatunkami, więc poza modelem mysim prowadzi się również badania na szczurach (Ruby, Falvey, and Kulesza 2015; Hamilton et al. 2014; Asiminas et al. 2019; Till et al. 2015), muszce owocowej *Drosophila melanogaster* (Drozd, Bardoni, and Capovilla 2018) czy żabie szponiastej *Xenopus laevis* (Faulkner et al. 2015).

1.10.2. Nieprawidłowości w morfologii kolców dendrytycznych w zespole łamliwego chromosomu X

Na poziomie komórkowym zaobserwowano, że brak ekspresji genu *fmr1* w neuronach objawia się nieprawidłową morfologią kolców dendrytycznych (Comery et al. 1997). Zarówno u myszy *Fmr1* KO i pacjentów z FXS zauważono przewagę kolców niedojrzałych o kształcie filopodium nad dojrzałymi kolcami o kształcie grzybkowatym w stosunku do kontroli (Bilousova et al. 2009; Grossman et al. 2006), co przedstawia rycina 15. Ta zależność jest najbardziej wyraźna podczas rozwoju (Antar et al 2006), ale nie zmienia się znacznie na etapie dorosłości zwierzęcia (Grossman et al. 2006). Obserwowany fenotyp może być skutkiem zaburzonego procesu dojrzewania i/lub zależnej od stymulacji synaptycznej przebudowy kolców dendrytycznych. Postuluje się, że zaburzona morfologia kolców i związane z tym nieprawidłowości w przekazywaniu sygnałów między neuronami jest główną przyczyną symptomów FXS (Dansie et al. 2013).



Rycina 15. Trójwymiarowa rekonstrukcja zdjęcia z mikroskopu konfokalnego: dendryty hipokampa z myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO w wieku 1 tygodnia wyznakowane fluorescencyjnym barwnikiem DiI. Uwidoczniono przewagę kolców dojrzałych w kontroli a kolców wydłużonych i niedojrzałych w hipokampie myszy pozbawionych genu *Fmr1*. Na podstawie (Bilousova et al. 2009).

Niezwykle ważnym enzymem przyczyniającym się do zmian morfologii kolców dendrytycznych jest metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (ang. matrix metalloproteinase-9, MMP-9), dzięki czemu pełni rolę w plastyczności synaptycznej (Vafadari, Salamian, and Kaczmarek 2016). Zespół badawczy, w którym prowadzono badania do niniejszej pracy doktorskiej odkrył, że białko FMRP kontroluje też proces lokalnej translacji enzymu MMP-9 (Dziembowska et al. 2012), co skutkuje zwiększonym poziomem tej proteazy na synapsach myszy *Fmr1* KO (Janusz et al. 2013). Podwyższony poziom MMP-9 został również zaobserwowany we krwi pacjentów z FXS (Dziembowska et al. 2013). Okazało się, że podawanie oseskom myszy *Fmr1* KO minocykliny - antybiotyku z grupy tetracyklin będącego inhibitorem MMP-9 - skutkuje obniżeniem aktywności MMP-9 do poziomu obserwowanego u myszy o genotypie dzikim (Bilousova et al. 2009). Co więcej, minocyklina przywracała właściwą proporcję kolców dendrytycznych, redukowała zachowania lękowe oraz poprawiała wyniki w teście mierzącym uczenie się zależne od hipokampu (Bilousova et al. 2009). Dlatego, wśród innych obecnie testowanych strategii farmakologicznych, minocyklina jest obiecującym lekiem w leczeniu FXS (Berry-Kravis et al. 2018).

1.11. Regulacja ekspresji neuroligin przez białko FMRP - uzasadnienie tematyki badań

Jak opisano wcześniej, ze względu na istotną rolę jaką pełni białko FMRP w procesie translacji prowadzono badania mające na celu identyfikację transkryptów, z którymi oddziałuje białko FMRP (Brown et al. 2001; Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005; Darnell et al. 2011). Brak białka FMRP prowadzi do podwyższonej ekspresji wielu ważnych białek synaptycznych skutkując objawami zespołu łamliwego chromosomu X. Z kolei wykazano, że nadekspresja NLGN1 prowadzi do zaburzeń w plastyczności synaptycznej i procesie zapamiętywania poprzez brak równowagi pomiędzy pobudzeniem i hamowaniem w hipokampie (Dahlhaus et al. 2010).

Dotychczas dwa niezależne zespoły badawcze zasugerowały, że białko FMRP może oddziaływać z mRNA neuroligin (Dahlhaus and El-Husseini 2010; Darnell et al. 2011). Wyniki wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA po sieciowaniu UV i immunoprecypitacji (HITS-CLIP) wykazały, że białko FMRP może oddziaływać z mRNA *Nlgn2* i *Nlgn3* w homogenatach z całej kory mózgowej i mózdzku myszy w wieku

P11-P25 (Darnell et al. 2011). Z kolei, druga grupa badawcza wskazała, że białko FMRP może oddziaływać z mRNA *Nlgn1* i *Nlgn2* (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Te wyniki zostały uzyskane na podstawie współwytrącania RNA z całych ekstraktów mózgu dorosłych myszy WT i *Fmr1* KO w wieku 2,5-6 miesięcy i przedstawione w postaci prążków na żelu po reakcji odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimerazy (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Powyższe dane na temat interakcji białka FMRP z mRNA neurologin, a zatem też potencjalnej regulacji translacji neurologin przez FMRP były niespójne.

Neurologiny są kluczowymi białkami synaptycznymi, których poziom na synapsie jest ściśle regulowany na różnych etapach ekspresji, również poprzez cięcie proteolityczne jak wykazano dla NLGN1 i NLGN3 (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012; Venkatesh et al. 2017). Co więcej, wykazano, że odcięty fragment NLGN3 ma właściwości mitogenne i stymuluje rozwój glejaków (Venkatesh et al. 2015). W świetle powyższych doniesień zbadanie dokładnego mechanizmu regulacji ekspresji neurologin w synapsie wydaje się niezwykle istotne.

2. Założenia i cel pracy

Ogólnym założeniem mojej pracy doktorskiej było zbadanie regulacji ekspresji ważnych białek adhezyjnych – neuroligin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X.

Osiągnięcie powyższego celu pracy doktorskiej zaplanowano poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

1. Sprawdzenie czy białko FMRP reguluje proces lokalnej translacji neuroligin przez porównanie poziomu mRNA i białka neuroligin 1, 2, 3 w synaptoneurosomach i pierwotnej hodowli neuronalnej z myszy typu dzikiego oraz *Fmr1* KO.
2. Zbadanie oddziaływania białka FMRP z mRNA neuroligin 1, 2, 3 w dwóch modelach badawczych – synaptoneurosomach oraz pierwotnej hodowli neuronalnej.
3. Charakterystyka zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji neuroligin 1, 2, 3 w synapsie w warunkach fizjologicznych oraz w mysim modelu zespołu łamliwego chromosomu X.
4. Zbadanie procesu cięcia proteolitycznego neuroligin 1, 2 i 3 na synapsie w warunkach fizjologicznych oraz u myszy pozbawionych ekspresji genu *Fmr1* i *Mmp-9*.

3. Materiały i metody

3.1. Lista buforów i roztworów

Do wszystkich buforów używano wody destylowanej „Mili-Q”, pozyskiwanej z aparatu produkcji Milipore (oporność 18.2 MΩ·cm w 25°C, filtrowana przez filtr o średnicy porów 0,22 μm).

Bufor do lizy – 0,5 % SDS, 100 mM NaCl, 100 mM bufor Tris-HCl, 1 mM EDTA, proteinaza K w stosunku 1:10

Bufor TE – 10 mM bufor Tris-HCl, 1 mM EDTA

5 x bufor TBE do elektroforezy DNA w żelu agarozowym – 450 mM Tris, 450 mM kwas borowy, 10 mM EDTA (pH 8,0)

Bufor do homogenizacji synaptoneurosomów – 118 mM NaCl, 1,18 mM MgSO₄, 1,18 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 3,8 mM MgCl₂, 212,7 mM glukozy, 24,9 mM NaHCO₃ (pH 7,4); mieszanina inhibitorów proteaz bez EDTA – cOmplete (Roche); 120 U/ml inhibitor RNaz RiboLock (Thermo Scientific). Przed ustaleniem pH bufor chłodzono w łaźni lodowej do 4°C. Odczyn buforu ustalano za pomocą naprzemiennego nasycania dwutlenkiem węgla z użyciem suchego lodu i napowietrzania.

Niedenaturujący bufor Laemmli’ego 5x – 60 mM Tris-HCl, 10% SDS, 50% glicerol (gliceryna), 0,01% błękit bromofenolowy (pH 6,8). SDS dodawano do roztworu w postaci proszku. Niedenaturujący bufor Laemmli’ego przechowywano w temperaturze pokojowej. Aby zrobić **denaturujący** bufor Laemmli’ego, do buforu powyżej dodawano DTT do końcowego stężenia 100 mM w 1 x buforze. Denaturujący bufor Laemmli’ego przechowywano w -20°C.

Bufor do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym, prowadzonej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), stężenie 1 x – 25 mM Tris, 250 mM glicyna, 0,1% SDS

Bufor do transferu pól suchego sieciowanych białek na membranę, stężenie 1 x – 300 mM Tris, 298 mM glicyna, 3,5 SDS, 20% etanol

Bufor do transferu Turbo pozostałych białek na membranę, stężenie 1 x – 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% etanol

Bufor PBS – 10 mM fosforan sodu, 2,68 mM KCl, 140 NaCl (pH 7,4); bufor przygotowywano z tabletek (Gibco), wolnych od DNaz i RNaz

Bufor PBST – PBS z dodatkiem 0,1% detergentu Tween-20

Bufor do oczyszczania membran z przeciwciał („strippingu”) – 0,1 M glicyna, 2% SDS (pH 3,0). Odczyn ustalano za pomocą stężonego HCl

Paraformaldehyd do utrwalania komórek – Do 50 ml PBS (pH 7,4) dodawano 2 g paraformaldehydu. Roztwór ogrzewano w 60°C, wytrząsając co pewien czas, aż do całkowitego rozpuszczenia proszku. Powstały roztwór 4% PFA przed użyciem filtrowano przez filtr o średnicy porów 0,22 µm.

Bufor do współwytrącania RNA – 10 mM HEPES, 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 (pH 7,4), mieszanina inhibitorów proteaz bez EDTA - cOmplete (Roche), 80 U / ml inhibitor RNaz RiboLock (Thermo Scientific)

Bufor do płukania kulek magnetycznych Dynabeads™ Protein A – 0,1 M fosforan sodu, 0,01% Tween 20 (pH 8,2)

HBSS (zbilansowany roztwór soli Hanka, Hank's balanced salt solution) – 5,33 mM KCl, 0,441 mM KH₂PO₄, 4, 17 mM NaHCO₃, 137,93 mM NaCl, 0,338 mM Na₂HPO₄, 5,56 mM D-glukoza

Bufor do acetylacji – 0,1 M trietanolamina, 0,25% HCl, 0,25% bezwodnik kwasu octowego

Bufor do prehybrydyzacji – Prehybridization Solution 2 x Concentrate (Sigma) rozcieńczano 1:1 z formamidem

Bufor TNB do blokowania przed reakcją z tyramidem – 0,1M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5% Blocking Reagent – dostarczony przez producenta w zestawie Cy5 TSA Plus System (Perkin Elmer)

SSC (bufor cytrynianowy) – 0,015 M cytrynian sodu, 0,15 M NaCl (pH 7). Bufor przygotowywano z gotowego roztworu 20 x SSC, wolnego od DNaz i RNaz (Sigma)

3.2. Zwierzęta

Do przeprowadzenia doświadczeń do pracy doktorskiej wykorzystano:

- Myszy pozbawione ekspresji genu *Fmr1* (ang. *Fmr1* knock-out, *Fmr1* KO) będące genetycznym modelem zespołu łamliwego chromosomu X oraz ich rodzeństwo z tego samego miotu o genotypie dzikim (ang. wild type, WT). Myszy *Fmr1* KO

otrzymaliśmy w ramach współpracy z prof. Claudią Bagni z Uniwersytetu w Lozannie w Szwajcarii, ich tłem genetycznym jest szczep FVB, dokładna nazwa to FVB.129P2(B6)-*Fmr1*^{tm1Cgr}/J (#003024 w laboratorium Jackson).

- Myszy pozbawione ekspresji genu *Nlgn3* (*Nlgn3* KO), scharakteryzowane w publikacji (Varoqueaux et al. 2006 oraz Radyushkin et al. 2008) otrzymano w ramach współpracy z profesorem Nils Brose z Instytutu Medycyny Eksperymentalnej w Getyndze w Niemczech.
- Myszy pozbawione ekspresji genu *Mmp-9* (*Mmp-9* KO), scharakteryzowane w publikacji (Vu et al. 1998) otrzymano w ramach współpracy z dr Marzeną Stefaniuk z Zakładu Neurobiologii z Instytutu im. Marcela Nenckiego, PAN w Warszawie.
- Oseski P0 (ang. postnatal day 0) szczurów Wistar o genotypie dzikim.

Hodowla zwierząt była prowadzona w trybie ciągłym z nieograniczonym dostępem do wody i konwencjonalnych pasz laboratoryjnych dla myszy oraz z 12 godzinnym cyklem światła i 12 godzinnym cyklem ciemności. Myszy były hodowane w zwierzętarni Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, a szczury w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN w Warszawie. Pobieranie tkanek z myszy było przeprowadzane po uzyskaniu zezwolenia na planowanie, uśmiercanie i wykonywanie doświadczeń na zwierzętach oraz zgodnie ze standardami Lokalnej Komisji Etycznej.

- Myszy o genotypie dzikim stanowiły grupę kontrolną, co umożliwiło obserwację procesów w warunkach fizjologicznych.
- Myszy pozbawione ekspresji genu *Fmr1* (*Fmr1* KO) stanowiły grupę eksperymentalną, pozwalającą na badanie zaburzeń molekularnych występujących w zespole łamliwego chromosomu X.
- Myszy pozbawione ekspresji genu *Nlgn3* (*Nlgn3* KO) zostały użyte do identyfikacji specyficznych prążków reprezentujących przecięte fragmenty NLGN3.

- Myszy pozbawione ekspresji genu *Mmp-9* (*Mmp-9* KO) stanowiły grupę eksperymentalną, pozwalającą na weryfikację cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach oraz próbę identyfikacji proteaz odpowiedzialnych za ten proces.
- Oseki szczurów Wistar o genotypie dzikim zostały użyte do zakładania pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych.

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone z użyciem wyłącznie młodych dorosłych samców WT i *Fmr1* KO w przedziale wiekowym 26-60 dni po urodzeniu (P26-60). Dwa samce *Nlgn3* KO użyte do weryfikacji ciętych prążków NLGN3 były w wieku P30 (Rycina 47). Do eksperymentów z inhibitorami proteaz użyto samic WT (Rycina 49, 50) oraz samców *Mmp-9* KO (Rycina 52) w wieku 8 miesięcy. Do izolacji synaptoneurosomów z myszy WT i *Mmp-9* KO będących rodzeństwem użyto samców w wieku 5 miesięcy (Rycina 51). Przedział wiekowy myszy użytych do poszczególnych eksperymentów był zawężony tak by myszy były jak najbardziej zbliżone wiekiem, z różnicą maksymalnie 10 dni w eksperymentach, w których wymagana była duża grupa myszy.

3.3. Genotypowanie

Przed użyciem do eksperymentów myszy były genotypowane zgodnie z protokołem z laboratorium Jackson. W tym celu końcówki ogonów myszy w wieku około 3 tygodni zostały poddane lizie w buforze do lizy (0,5 % SDS, 100 mM NaCl, 100 mM bufor Tris-HCl, 1 mM EDTA, proteinaza K w stosunku 1:10 (#03115828001, Roche) przez 5-6 godzin w 55 C, po czym proteinazę K dezaktywowano przez 10 minut w 98°C. Próbkę po lizie rozcieńczano w buforze TE (10 mM bufor Tris-HCl, 1 mM EDTA) w stosunku 1:40. Reakcja łańcuchowa polimerazy zawierała 2 µl rozcieńczonego DNA, 9,25 µl wody MiliQ, 2,5 µl 10x buforu do PCR (Invitrogen), 2 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 µl 5x buforu Qiagen Q Solution (Qiagen), 1 µl dNTP (Qiagen), 0,25 µl polimerazy Taq (Invitrogen) i po 1 µl starterów o sekwencjach zamieszczonych w tabeli 4. Amplifikacja DNA przebiegała w następujących warunkach PCR: 94°C przez 3 minuty; 94°C przez 30 sekund, 62°C przez 30 sekund, 72°C przez 1 minutę przez 38 cykli; oraz 72°C przez 10 minut. Do produktów reakcji łańcuchowej polimerazy dodano 6-krotnie stężony bufor obciążający i w ten sposób otrzymane próbki poddano

elektroforezie DNA w 1,5% żelu agarozowym obok kontroli pozytywnej (próbki WT i *Fmr1* KO) i negatywnej (reakcja PCR z 2 µl wody zamiast DNA) oraz markera wielkości DNA. Elektroforezę DNA prowadzono przez 30 minut przy napięciu 100 V. Prążek o wielkości 131 par zasad wskazywał na mysz o genotypie dzikim, prążek o wielkości 400 par zasad odpowiadał myszy pozbawionej ekspresji genu *Fmr1*, a obecność obu prążków w jednej studziencie oznaczała mysz o genotypie heterozygoty.

Starter	Sekwencja nukleotydowa 5'-3'
Forward – genotyp <i>Fmr1</i> KO	CACGAGACTAGTGAGAGGTG
Forward – genotyp dziki WT	TGTGATAGAATATGCAGCATGTGA
Reverse	CTTCTGGCACCTCCAGCTT

Tabela 4. Sekwencja nukleotydowa starterów użytych do genotypowania myszy.

3.4. Izolacja synaptoneurosomów z hipokampa i kory mózgu myszy

Synaptoneurosomy izolowano z samców myszy WT i *Fmr1* KO w wieku P26-P60 za pomocą filtracji przez membrany o zmniejszającej średnicy porów jak opisano wcześniej przez nas i inne grupy badawcze (Kuzniewska et al. 2018; Chmielewska et al. 2019; Janusz et al. 2013; Hollingsworth et al. 1985). Z obu półkul mózgu wyizolowano hipokampy wraz przyległą częścią kory mózgowej (w celu zachowania korowo-hipokampalnych połączeń synaptycznych). Izolację tkanek przeprowadzano na szklanej szalce wypełnionej lodem. Wszystkie etapy izolacji odbywały się z wykorzystaniem schłodzonych uprzednio materiałów. Tkanę z jednej półkuli mózgu homogenizowano ręcznie (12-14 pociągnięć ciasnym tłoczkiem) w szklanym homogenizatorze Pottera w 1,5 ml lodowatego buforu do homogenizacji (HB) zawierającego (w mM) 118,5 NaCl, 1,18 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 2,5 CaCl₂, 3,8 MgCl₂, 212,7 glukozy, 24,9 NaHCO₃ o pH 7,4 ustawionym za pomocą naprzemiennego nasycania dwutlenkiem węgla i napowietrzania. Bufor do homogenizacji zawsze był uzupełniony koktajlem inhibitorów proteaz cComplete wolnych od EDTA (Roche), a w przypadku izolacji RNA dodatkowo zawierał 120 U/ml inhibitorów RNaz RiboLock (#EO0381, Thermo Scientific). Homogenat rozcieńczano do końcowej objętości 10 ml HB na jeden mózg, a następnie w chłodni przeprowadzano filtrację w celu oddzielenia pozostałości niehomogenizowanej tkanki i jąder komórkowych. Homogenat przesączano przez serię nylonowych filtrów

siateczkowych (Merck Millipore) o średnicy porów kolejno: 100 μm , 60 μm , 30 μm i 10 μm , które umieszczono w przeznaczonych do tego adpatorach Swinnex Filter Holder 25 mm (Merck Millipore). Kolumnę do filtracji grawitacyjnej stanowiła strzykawka połączona z adaptorem. Filtrat wirowano przy prędkości 1000 rcf przez 15 min w 4°C. Osad zawierający preparat synaptoneurosomów delikatnie roztwarzano w 5 ml HB za pomocą pipety automatycznej na objętość 5 ml, wirowano jak poprzednio i zawieszano w odpowiedniej objętości HB, którą dzielono na równe porcje. Przykładowo do doświadczeń zaprezentowanych na Rycinach 32, 38, 43 użyto 2 myszy na genotyp, synaptoneurosomy zawieszono w 1 ml HB i podzielono na pięć porcji po 200 μl . Wzbogacenie frakcji synaptoneurosomalnej w białka synaptyczne w porównaniu do homogenatów z tych samych struktur mózgu myszy WT weryfikowano za pomocą metody Western blot jak opisano poniżej.

3.5. Stymulacja receptorów NMDA *in vitro* na synaptoneurosomach

Protokół stymulacji receptorów NMDA *in vitro* na synaptoneurosomach opisano wcześniej (Kuzniewska et al. 2018; Dziembowska et al. 2012; Scheetz, Nairn, and Constantine-Paton 2000). Próbkę świeżo izolowanych synaptoneurosomów ogrzewano wstępnie przez 3 minuty w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm. Jonotropowe receptory dla glutaminianu NMDA stymulowano poprzez dodanie agonistów tych receptorów: NMDA (stężenie końcowe 50 μM , Sigma-Aldrich) i glutaminianu (stężenie końcowe 10 μM , Sigma-Aldrich) na czas inkubacji przez 30 sekund w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm. Stymulację przerywano poprzez dodanie antagonisty receptorów NMDA – APV (kwasu DL-2-amino-5-fosfonowalerianowego, stężenie końcowe 120 μM , Sigma-Aldrich). Inkubację tak stymulowanych próbek prowadzono przez 2.5, 5, 10 i 20 minut w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm, by umożliwić w tym czasie aktywację szlaków biochemicznych prowadzących m.in. do lokalnej syntezy białka. Po tym czasie próbki przenoszono na lód. Próbki niestymulowane (poziom podstawowy, P) były w tym czasie inkubowane na lodzie.

3.6. Inkubacja synaptoneurosomów z inhibitorami proteaz

Przed stymulacją receptorów NMDA, synaptoneurosomy izolowane z mózgu myszy WT i *Mmp-9* KO inkubowano przez 10 minut na lodzie z inhibitorem I MMP-9/-

13i (stężenie końcowe 5 μM lub 1 μM ; #444252, CAS no 204140-01-2, Calbiochem) lub inhibitorem GM6001 (stężenie końcowe 1 μM lub 100 nM; #2983, CAS no 142880-36-2, batch 5, Tocris Bioscience). W tym celu proszek zawierający inhibitory proteaz rozpuszczono w 100% DMSO i rozcieńczono w HB do odpowiedniego stężenia. Po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach, inkubację próbek prowadzono przez 2.5 lub 10 minut w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm.

3.7. Pomiar stężenia białka

Po 20-krotnym rozcieńczeniu próbki synaptoneurosomów wodą mierzono stężenie białka za pomocą testu BCA Pierce (Thermo Scientific) w dwóch powtórzeniach dla każdej próbki na płytkach 96-dołkowych stosując się do zaleceń producenta. Wynik pomiaru odczytywano przy użyciu spektrofotometru w czytniku płytek Syngery H1 (BioTek) przy długości fali 562 nm. W przypadku testu Bradforda (Bio-rad) stężenie białka w próbce mierzono w kuwetach za pomocą Spektrofotometru D30 (Eppendorf) według instrukcji producenta. Wyniki pomiarów absorbancji przeliczano na stężenie białka w próbce używając krzywej standardowej.

3.8. Współwytrącanie RNA

Współwytrącanie RNA z przeciwciałem anti-FMRP przeprowadzono jak opublikowano we wcześniejszych pracach zespołu (Janusz et al. 2013; Jasinska et al. 2016). W tym przypadku stężenie białka mierzono za pomocą testu Bradforda (Bio-rad). Następnie, 1,6 mg całkowitego białka ze świeżo izolowanych synaptoneurosomów z hipokampów i przyległej części kory mózgowej samców P26-33 myszy WT i *Fmr1* KO lizowano w 1200 μl buforu do precypitacji (10 mM HEPES o pH 7,4, 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0,5% Triton X-100) z koktajlem inhibitorów proteaz cOmplete (Roche) i 80 U / ml RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific). Wstępne łączenie ekstraktu przeprowadzono przez 4 godziny z 120 μl (3,6 mg) przepłukanych dwukrotnie kulek magnetycznych DynabeadsTM Protein A (Invitrogen) z obracaniem. Bufor do płukania kulek DynabeadsTM Protein A zawierał 0,1 M fosforan sodu, 0,01% Tween 20 (pH 8,2). Następnie 100 μl z każdego supernatantu pobrano jako frakcję wejściową (ang. input) w celu przeprowadzenia analizy Western blot z przeciwciałem anti-FMRP do określenia wydajności tego etapu procedury. Wstępnie oczyszczone próbki wytrącano przez noc w

4°C podczas obracania z 120 µl kulek Dynabeads Protein A związanych uprzednio z przeciwciałem anti-FMRP (7G1-1, Developmental Studies Hybridoma Bank) lub kontrolnym mysim przeciwciałem anti-IgG (#sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) – immunoglobulinami G wyizolowanymi z myszy nie poddanych immunizacji. Następnie, odebrano frakcję 1/5 objętości próbki immunoprecypitatów (ang. immunoprecipitate, IP), którą przepłukano i zdenaturowano w 98°C w buforze Laemmli’ego na potrzeby analizy Western blot potwierdzającej specyficzność reakcji. Z pozostałej 4/5 objętości próbki po uprzednim przepłukaniu wyizolowano całkowity RNA za pomocą odczynnika TRIzol (Ambion) stosując się do instrukcji producenta. Oceny ilościowej i jakościowej wyizolowanego RNA przeprowadzano metodą spektrofotometryczną za pomocą spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Czystość RNA oceniano na podstawie stosunku absorbancji przy długości fali 260/280 nm ($\geq 1,8$) oraz 260/230 nm ($\geq 1,8$).

3.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji (ang. reverse transcription) przeprowadzono z użyciem 1 µg RNA do porównań mRNA pomiędzy genotypami (Rycina 23) lub 74 µg RNA po współwytrącaniu RNA z przeciwciałem anti-FMRP lub anti-IgG (Rycina 25). Stosowano odwrotną transkryptazę SuperScript IV (Thermo Scientific) według instrukcji producenta (#18090010, Thermo Scientific). W pierwszym kroku do RNA dodawano 1 µl 10 mM mieszaniny dNTP (#71004-3, Sigma-Aldrich), 200 ng (0,5 µl) mieszaniny losowych starterów (ang. random hexamer primers N6, #S300, GeneON) i wodę do objętości 13,5 µl. Po wymieszaniu przez pipetowanie mieszaninę ogrzewano w termocyklerze przez 5 minut w 65°C, chłodzono na lodzie przez 1 minutę a następnie dodawano następujące składniki mieszaniny reakcyjnej: 4 µl 5 x stężonego buforu reakcyjnego (Thermo Scientific), 1 µl 100 mM DTT (Thermo Scientific), 0,5 µl inhibitora RNaz Ribolock (40 U / µl) i 1 µl enzymu odwrotnej transkryptazy (200 U / µl) do końcowej objętości 20 µl. Po wymieszaniu i odwirowaniu próbki poddano inkubacji w termocyklerze (Bio-rad) z zastosowaniem programu zamieszczonego w tabeli 5. Uzyskane w ten sposób cDNA przechowywano w -80°C.

Temp [°C]	czas
25	5 min
55	60 min
70	15 min

Tabela 5. Program reakcji odwrotnej transkrypcji w termocyklerze Bio-rad.

3.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej próbki przy użyciu termocyklera Light Cycler 480 (Roche). W końcowej objętości 15 µl reakcji znajdowało się: 2,5 µl cDNA i 12,5 µl Light Cycler 480 Master Mix (Roche) zawierającego 7,5 µl 2 x stężonego buforu TaqMan, 0,75 µl odpowiedniej sondy TaqMan uzupełnionego wodą do objętości 12,5 µl. Nazwy komercyjnie dostępnych mieszanin starterów i sond TaqMan (Thermo Scientific) wykorzystanych w niniejszej pracy zawarto w tabeli 6. Reakcja była prowadzona w 96-dołkowej płytce FrameStar 480/96 (#4ti-0953, 4titude) zaklejonej folią (#4ti-0560, 4titude). Po wymieszaniu i odwirowaniu próbki poddano inkubacji w termocyklerze Light Cycler 480 (Roche) stosując program zamieszczony w tabeli 7.

Nazwa genu	Nazwa sondy TaqMan
<i>Nlgn1</i>	Mm02344307_m1
<i>Nlgn2</i>	Mm01703404_m1
<i>Nlgn3</i>	Mm01225951_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Psd-95</i>	Mm00492193_m1
<i>LSm</i>	At02174020_g1

Tabela 6. Nazwy komercyjnie dostępnych sond TaqMan (Roche) użytych do reakcji qRT-PCR.

Krok	Temp [°C]	Czas
Inkubacja wstępna	95	10 min
Amplifikacja (x 45 cykli)	95	10 sek
	60	50 sek
	72	1 sek
Chłodzenie	40	30 sek

Tabela 7. Program reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w termocyklerze Roche.

Obliczenia wykonano metodą 2 (-ddCt). W przypadku ryciny 23 całkowity RNA wyizolowano z synaptoneurosomów samców myszy WT i *Fmr1* KO w wieku P30-40 używając odczynnika TRIzol (Ambion). Reakcje odwrotnej transkrypcji oraz qRT-PCR zostały przeprowadzone jak opisano powyżej używając sond TaqMan dla genów *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*, *Gapdh* i *Psd-95*. Wartości zostały obliczone za pomocą metody 2 (-ddCt) używając gen *Gapdh* do normalizacji danych. Porównania między genotypami w ramach analizy statystycznej przeprowadzono przy użyciu dwustronnego niesparowanego testu *t* Studenta w programie GraphPad Prism wersji 7.03, n=6 myszy/genotyp (Rycina 23). W przypadku ryciny 25 analizę statystyczną z 3-4 niezależnych eksperymentów (n=3-4, 1 mysz/genotyp na jeden eksperyment) przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowego testu ANOVA wielokrotnych porównań Sidak w programie GraphPad Prism wersji 7.03 (Rycina 25).

3.11. Pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych

Pierwotne hodowle neuronów hipokampalnych zakładano ze świeżo urodzonych osesków myszy P0 WT i *Fmr1* KO, a także szczurów P0 WT Wistar obu płci. Około 120 000 zdysocjowanych neuronów umieszczano na szkiełkach nakrywkowych pokrytych 50 µg / ml poli-D-lizyny (Sigma-Aldrich) i 2,5 µg / ml lamininy (Roche) na 12-dołkowych plastikowych płytkach hodowlanych. Pożywkę hodowlaną składającą się z: Neurobasal A (Gibco) suplementu B-27 (Gibco), 1% penicyliny-streptomycyny (Sigma-Aldrich), 0,5 mM L-glutaminie (Sigma-Aldrich) i 12,5 µM glutamianu (Sigma-Aldrich) zastępowano 1 ml świeżej pożywki w DIV1 (1 dniu *in vitro*) i hodowle prowadzono w inkubatorze z 5% CO₂ w 37°C. W DIV10, DIV14 i DIV18 dodawano po 300 µl / dołek pożywki bez glutamianu w celu uzupełnienia składników odżywczych w hodowli. Hodowle neuronów mysich wykorzystywane były do sieciowania białek (DIV19) i/lub analizy Western blot (DIV21) w celu porównania ekspresji białek NLGN w stanie podstawowym. W tym celu komórki lizowano w buforze Laemmli'ego zawierającym 5% 2-merkaptoetanol. Wyniki podstawowego poziomu białek NLGN w mysich hodowlach neuronów hipokampalnych zostały obliczone na podstawie n=5-9 myszy/genotyp. Hodowle neuronów szczurzych wykorzystywane były do barwień immunofluorescencyjnych oraz obrazowania. W tym celu w DIV21 utrwalano je w 4%

paraformaldehydzie / 4% sacharozie w PBS przez 7 minut, a następnie płukano trzy razy w PBS i przechowywano w 4°C do czasu dalszych analiz.

3.12. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* i barwienia immunofluorescencyjne

W celu wizualizacji RNA neuroligin w neuronach za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) zaprojektowano antysensowne i sensowne (kontrolne) sondy oligonukleotydowe do fragmentu sekwencji kodującej i 3' UTR szczurzego cDNA Nlgn1, Nlgn2, Nlgn3. Sekwencje amplifikowano za pomocą metody PCR, stosując startery o sekwencjach zawartych w tabeli 8.

Gen	Starter przedni (forward)	Starter wsteczny (reverse)
<i>Nlgn1</i>	5'CACTCGAACTTTGGCTCACCC3'	5'GGAAAGGCTGATGTGACTGG'
<i>Nlgn2</i>	5'TCCGCCAGACACAGATATCC3'	5'CCCAAAGGCAATGTGGTAGC3'
<i>Nlgn3</i>	5'AGCTCTACCTTCACATCGGG3'	5'GACCCAACTGTAATGCTGCC3'

Tabela 8. Sekwencje nukleotydowe starterów użytych do stworzenia antysensownych i sensownych sond oligonukleotydowych do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

Powielone fragmenty zostały wklonowane do plazmidu pCR II przy użyciu zestawu TA Cloning Kit (Invitrogen) według instrukcji producenta. Linearyzowane plazmidy służyły jako matryce do transkrypcji *in vitro* przy użyciu polimeraz RNA 5'-3' SP6/T7 (Roche) oraz fluoresceiny do znakowania RNA. Wyznakowanych fluoresceiną sond użyto do hybrydyzacji na utrwalonych szczurzych hodowlach hipokampalnych jak opisano w publikacji (Janusz et al. 2013). W skrócie, utrwalone komórki neuronów hipokampalnych przemyto za pomocą 1 ml PBS, potraktowano 1 ml H₂O₂ i acetylowano. Prehybrydyzację prowadzono w roztworze z 50% formamidem (Sigma-Aldrich) przez 3 godziny, po czym zastąpiono go roztworem do hybrydyzacji (Sigma-Aldrich) z antysensownymi lub sensownymi sondami w celu inkubacji przez noc w 67,5°C. Następnie komórki przemyto trzykrotnie 0,5 x stężonym buforem soli fizjologicznej z cytrynianem sodu (bufor SSC) w 65°C, trzykrotnie 0,2 x stężonym buforem SSC w 60°C, dwukrotnie 0,2 x stężonym buforem SSC w temperaturze pokojowej (ang. RT) i trzykrotnie PBS-Tween 0,1% (PBST) w RT. Następnie niespecyficzne wiązanie blokowano używając 10% NGS w roztworze blokującym TNB (TSA Plus System; PerkinElmer) przez 1 godzinę w RT. Komórki inkubowano z odczynnikami przeciwciałami

anty-fluoresceinowymi-POD (1:200 w TNB, #11426346910, Roche) i króliczymi przeciwciałami anty-FMRP (1:200 w TNB, #7104S, Cell Signaling) w nawilżanej komorze przez noc w 4°C, przemyto PBST i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem przeciw króliczym IgG skoniugowanym z fluoroforem Alexa 488 (1:1000, Invitrogen). Sygnał hybrydyzacji został wzmocniony za pomocą systemu TSA Cy3 System (PerkinElmer). Sygnał dodatni dla mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* współwystępujący z dodatnim sygnałem dla białka FMRP wizualizowano na długości 50 µm dendrytu w minimalnej odległości 20 µm od ciała neuronu za pomocą mikroskopu konfokalnego LSM 700, Axio Imager Z2 (Zeiss). W celu wizualizacji czerwonego sygnału odpowiadającego RNA *Nlgn* wykorzystano fluorofor Alexa 555, a żeby uwidocznić zielony sygnał pochodzący od białka FMRP zastosowano fluorofor Alexa 488. Obrazowanie przeprowadzano w skrawkach o przekroju Z o grubości 0,4 µm, stosując obiektyw 40x z immersją olejową (1,3 NA). Na rycinie 27 i 28 przedstawiono zdjęcia uzyskane z pojedynczej sekcji o grubości 0,4 µm przy współczynniku powiększenia 1,2 x stosując rozmiar ramki 1024 x 1024, więc rozmiar piksela wynosi 0,13 µm.

3.13. Chemiczne sieciowanie białek powierzchniowych z użyciem BS³ w synaptoneurosomach i hodowlach neuronów hipokampalnych

Synaptoneurosomy wyizolowane z samców myszy WT i *Fmr1* KO w wieku P40-50 w stanie podstawowym (P) oraz (2,5, 5, 10 i 20 minut) po stymulacji receptorów NMDA zostały poddane sieciowaniu białek powierzchniowych przy użyciu 2 mM BS³ (#21580, Thermo Scientific). BS³ jest nieprzepuszczalnym dla błony komórkowej chemicznym odczynnikiem sieciującym, który łączy białka ulegające ekspresji na powierzchni komórki (Boudreau et al. 2012). BS³ rozpuszczono w świeżo przygotowanym 5 mM buforze cytrynianu sodu o pH 5,0. Reakcja sieciowania została przeprowadzona przez 30 minut na lodzie, a proces zatrzymano przez dodanie 100 mM glicyny na czas 10 minut. Następnie próbki szybko zamrożono na suchym lodzie i przechowywano w - 80°C przed analizą Western blot. Wyniki eksperymentu przeprowadzonego na synaptoneurosomach obliczono z sześciu niezależnych eksperymentów (n=6 eksperymentów; 2 myszy na genotyp na każdy eksperyment, rycina 32, 38, 43).

W celu sieciowania białek powierzchniowych w mysich hodowlach neuronów hipokampalnych (DIV19), komórki przepłukano dwukrotnie buforem chelatującym jony dwuwartościowe (1 mM EDTA w HBSS), aby nie zakłócać zależnych od jonów Ca^{2+} interakcji NLGN-NRXN (Poulopoulos et al. 2012; Ichtchenko et al. 1995). Komórki inkubowano z 2 mM BS^3 w HBSS przez 30 minut na lodzie, po czym dodano 100 mM glicyny na czas 10 minut (Boudreau et al. 2012). Komórki poddano lizie w 1% SDS, 50 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl z koktajlem inhibitorów proteaz (Roche), a następnie sonikowano przy użyciu sonikatora Bioruptor Plus (2 x 5 sek. / 30 sek. przerwy), wirowano przy 20000 rcf przez 10 min w 4°C i zachowywano nadsącz z ekstraktów SDS. Przed analizą Western blot mierzono stężenie białka za pomocą testu BCA Pierce (Thermo Scientific). Wyniki sieciowania prezentowane na rycinie 33 i 39 zostały obliczone na podstawie 12 powtórzeń biologicznych dla każdego genotypu uzyskanych z czterech niezależnych hodowli neuronalnych (n=12 dołków hodowlanych/genotyp, po 3 dołki z każdej z czterech hodowli/genotyp).

3.14. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

Świeżo izolowane synaptoneurosomy z mózgów myszy WT i *Fmr1* KO w wieku P40-50 inkubowano z 5 mM biotyną (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotyn, #21335, Thermo Scientific) rozpuszczoną w HB o pH 8,0 przez 30 min w 4°C. Następnie próbki zwirowano przy 1000 rcf przez 10 minut w 4°C i osad synaptoneurosomów zawierających wyznakowane biotyną białka powierzchniowe przepłukano dwukrotnie PBS przed lizą w 1% TritonX-100 w PBS o pH 7,4. Następnie ekstrakty rozcieńczono 50-krotnie buforem do lizy i połączono z 50 μ l (0,5 mg) przepłukanych kulek Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen). Wiązanie kulek z biotynylowanymi białkami powierzchniowymi prowadzono przez 2 godziny w 4°C podczas obracania na rotorze. Potem kulki przemyto trzykrotnie buforem do lizy, dodano buforu Laemmli'ego zawierającego 100 mM DTT i 2,5 mM biotyny (Sigma-Aldrich) i zdenaturowano przez 10 min w 98°C. Próbki po elucji analizowano za pomocą metody Western blot. Przeprowadzono sześć niezależnych eksperymentów (n=6 eksperymentów; 2 myszy na genotyp na każdy eksperyment, rycina 35, 41, 45).

3.15. Deglikozylacja białek

Deglikozylację sieciowanych białek w celu analizy masy molekularnej białek przed i po tym procesie przeprowadzono z użyciem glikozydazy EndoH (endoglikozydaza H, #P0702, New England Biolabs) oraz PNGazy F (peptydowa N-glikozydaza F, #P0704, New England Biolabs) zgodnie z protokołami producenta (New England Biolabs).

3.16. Elektroforeza białek SDS-PAGE i Western Blot

Próbki inkubowano w 98°C przez 10 minut w denaturującym buforze Laemmli'ego, schładzano w temperaturze pokojowej, a następnie nakładano 20 µg na żel poliakrylamidowy SDS-PAGE, razem ze standardem wielkości Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10-300 kDa, Thermo Scientific). Podczas elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE ta sama ilość białka (z poszczególnych próbek o różnym stężeniu) była poddana rozdzielaniu w 7,5% żelu (białka sieciowane około 300 kDa), 12% żelu (aby obserwować małe odcięte fragmenty C-końcowe NLGN – cNLGN CTF około 25 kDa) lub 10% żelu (wszystkie inne analizy) poliakrylamidowym TGX Stain-Free (Bio-Rad). Następnie prowadzono elektryczny transfer białek na 0,45 µm membranę PVDF (Immobilon-P, Merck Millipore). Membrana PVDF została uprzednio aktywowana w metanolu przez 30 sekund, a następnie przełożona do buforu do transferu. Membranę umieszczono na warstwie 5 mm bibuły Whatman nasączonej buforem do transferu, następnie położono żel i przykryto warstwą nawilżonej bibuły. Białka sieciowane poddawano transferowi przez 1 godzinę 30 min przy napięciu 25 V w półsuchej komorze Trans-Blot (Bio-Rad) w buforze do transferu o składzie: 300 mM Tris, 298 mM glicyna, 3,5 mM SDS, 20% etanol. Pozostałe białka transferowano przez 5 min lub 7 min przy użyciu 25 V w komorze Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) w buforze do transferu zawierającym: 25 mM Tris, 192 mM glicynę i 20% etanol. Za każdym razem prowadzono kontrolę równej ilości białka nałożonego na żel oraz wydajności transferu obrazując żel przed i po transferze białek za pomocą systemu do wizualizacji żeli Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Membranę blokowano w 5% BSA i 3% normalnej surowicy krwi koziej (NGS) w PBST przez 1 h w temperaturze pokojowej. Lista użytych do doświadczeń przeciwciał pierwszorzędowych oraz ich rozcieńczeń została przedstawiona w tabeli 9. Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi prowadzono przez noc w 4°C z delikatnym wstrząśaniem.

Ekspresję białek będących markerami synaps pobudzających (PSD-95, VGLUT2, NLGN1, NLGN3) i hamujących (GEFRYNA, VGAT, NLGN2) analizowano w homogenatach i synaptoneurosomach pochodzących od myszy o genotypie dzikim w wieku P30-40. W celu dodatkowej kontroli ilości białka nałożonego na żel za każdym razem sprawdzano poziom GAPDH w synaptoneurosomach oraz białka β 3-TUBULINY w pierwotnych hodowlach hipokampalnych.

Nazwa i domena wykrywanego białka	Rozcieńczenie przeciwciała pierwszorzędowego	Numer katalogowy i nazwa producenta
NLGN1 domena zewnątrzkomórkowa	1:1000	#129111, Synaptic Systems
NLGN1 domena cytoplazmatyczna	1:1000	#129013, Synaptic Systems
NLGN2 domena cytoplazmatyczna	1:1000	#129511, Synaptic Systems
NLGN3 domena cytoplazmatyczna	1:2000	#129113, Synaptic Systems
β 3-TUBULINA	1:1000	#4466, Cell Signaling
FMRP	1:1000	#7104S, Cell Signaling
PSD-95	1:500	#MAB1598, Merck Millipore
VGLUT2	1:5000	#135403, Synaptic Systems
GEFRYNA	1:1000	#147111, Synaptic Systems
VGAT	1:1250	#131011, Synaptic Systems
GAPDH	1:1000	#MAB374, Merck Millipore

Tabela 9. Lista użytych do doświadczeń przeciwciał pierwszorzędowych wraz z ich rozcieńczeniem, numerem katalogowym i nazwą producenta.

Po trzykrotnym przepłukaniu membran w PBST inkubowano je z odpowiednio dobranymi drugorzędowymi przeciwciałami znakowanymi peroksydazą (Vector Laboratories) rozcieńczonymi 1:10 000 w 5% BSA w PBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym ponownie przepłukano je trzykrotnie w PBST. Białka zostały zwizualizowane metodą wzmocnionej chemiluminescencji używając odczynnika

do detekcji Amersham ECL Prime (GE Healthcare) i urządzenia Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Niektóre membrany inkubowano przez 20 minut w RT z buforem do strippingu o pH 3,0 zawierającym 0,1 M glicynę, 2% SDS. Następnie te membrany przepłukano trzykrotnie w PBST i traktowano jak opisano powyżej używając przeciwciała pierwszorzędowego wyprodukowanego w innym gospodarzu niż poprzednio użyte przeciwciała pierwszorzędowe. Intensywność pikseli w zwizualizowanym prążku odpowiadająca poziomowi ekspresji analizowanego białka została określona ilościowo przy użyciu oprogramowania ImageJ, odejmując tło dla każdego prążka na membranie. W doświadczeniach, w których porównywano poziom białka pomiędzy genotypami, wartości dla genotypu *Fmr1* KO zostały zrelatywizowane do wartości genotypu WT. W przypadku eksperymentów ze stymulacją synaptyczną wszystkie obliczone densytometrycznie wartości intensywności prążków zostały zrelatywizowane do wartości genotypu WT w stanie podstawowym (WT P) (Rycina 32, 38, 43). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu dwustronnego niesparowanego testu t Studenta dla porównań między genotypami i sparowanego testu t Studenta dla porównań w obrębie genotypu w programie GraphPad Prism wersji 7.03.

3.17. Profilowanie polirybosomów, izolacja RNA, qRT-PCR i obliczenia

Fracjonowanie polirybosomów przeprowadzono zgodnie z opublikowanym niedawno przez nasz zespół badawczy szczegółowym protokołem (Kuzniewska et al. 2020). Synaptoneurosome wyizolowane z hipokampów i przyległej części kory mózgu samców myszy P60 WT i *Fmr1* KO stymulowano przez 20 minut jak opisano powyżej i lizowano w buforze A (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 125 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 200 µg / ml cykloheksymidu, 120 U / ml RiboLock RNase Inhibitor i koktajl inhibitorów proteaz) zawierającym 1,5% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich). Struktury błoniaste usunięto przez wirowanie przy 20 000 x g przez 15 minut w 4°C. Supernatant załadowano na 10–50% wag./wag. liniowy gradient sacharozy przygotowany w buforze A i wirowano przy 38 000 rpm przez 2 godziny w rotorze TH641 w wirówce Sorvall WX Ultra Series (Thermo Scientific). Każdy gradient został podzielony na dwadzieścia trzy frakcje (po 500 µl), które zostały połączone w trzy frakcje (kompleksy rybonukleoproteinowe [ang. messenger ribonucleoprotein complexes, mRNP] i monosomy, lekkie polisomy i ciężkie polisomy) zgodnie z profilem absorbancji

polirybosomów monitorowanym przy długości fali 254 nm przy użyciu ISCO UA-6 UV / Detektor VIS. Każdą frakcję uzupełniono liniowym akryloamidem (do 20 µg / ml) i 10 ng transkrybowanego *in vitro* fragmentu genu *LSm* *Arabidopsis thaliana* jako wewnętrznej kontroli. Następnie całkowity RNA ekstrahowano w temperaturze -80°C przez noc poprzez dodanie 1:10 objętości 3 M octanu sodu o pH 5,2, 40 µg glikogenu jako wzmacniacza wytrącania i jednej objętości izopropanolu. Po odwirowaniu osad rozpuszczono w buforze do trawienia proteinazą K (0,5% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl o pH 7,4) i dodano enzym proteinazę K (końcowe stężenie 100 µg / ml) w celu inkubacji przez 20 min w 42°C z wytrząsaniem. Następnie RNA wyekstrahowano dwiema objętościami roztworu fenolu/chloroformu/alkoholu izoamylowego (25: 24: 1, Sigma-Aldrich) w probówkach Phase lock Gel Heavy 2 ml (5 Prime). RNA z fazy wodnej ponownie wyekstrahowano jedną objętością chloroformu i wytrącono przez noc z 2,5 objętości 96% etanolu i 1:10 objętości 3 M octanu sodu o pH 5,2 w -80°C. Po odwirowaniu osad przepłukano dwukrotnie w 70% etanolu, raz w 96% etanolu, suszono pod wyciągiem przez około 7 minut i rozpuszczono w 30 µl wody wolnej od RNaz. Stężenie i jakość wyizolowanego RNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru DS-11 (DeNovix). RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu losowych starterów (GeneON) i odwrotnej transkryptazy SuperScript IV (Thermo Scientific). Ilościowy qRT-PCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera Light Cycler 480 Probes Master Mix (Roche) oraz mieszanin starterów i sond TaqMan dla genów *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*, *Gapdh* i *LSm* (wymienione w tabeli 6) w końcowej objętości 15 µl. Wartości zostały obliczone przy użyciu metody 2 (-ddCt) traktując *LSm* jako zewnętrzną kontrolę w celu normalizacji danych. Analizę statystyczną z 4 niezależnych eksperymentów (n=4; 2 myszy na genotyp na każdy eksperyment; około 100 mg tkanki izolowanej dla stanu podstawowego/stymulacji) przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowego testu ANOVA (do analiz w obrębie genotypu) i dwukierunkowego testu ANOVA (do porównań między genotypami) w programie GraphPad Prism wersji 7.03.

3.18. Detekcja nowo zsyntetyzowanych białek za pomocą chemii Click-iT

Aby wykryć syntezę białek *de novo* użyto alkinowego analogu puromycyny: O-propargilopuromycyny (OP-puro, #NU-931-05, Jena Bioscience). OP-puro tworzy kowalencyjne koniugaty z nowopowstającymi łańcuchami polipeptydowymi, które

można wykryć w reakcji chemii klik, czyli cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej przez miedź (I) (ClickiT). Po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach wyizolowanych z mózgu myszy o genotypie dzikim w wieku P30-40, inkubację próbek prowadzono przez 20 minut w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm. Przed zakończeniem inkubacji dodano digitoninę (0,02%) oraz OP-puro do stężenia 50 μ M i synaptoneurosomy inkubowano dodatkowo w 37°C przez 3 minuty, aby umożliwić wbudowanie OP-puro do nowopowstających białek. Próbki kontrolne inkubowano bez OP-puro. Następnie synaptoneurosomy zawieszono w buforze do lizy (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS) i przeprowadzono reakcję chemiczną ClickiT z azydkiem TAMRA lub azydkiem biotyny (Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta. Po reakcji z azydkiem TAMRA białka wytrącono metanolem, a osad rozpuszczono w buforze Laemmli'ego zawierającym 100 mM DTT i denaturowano przez 10 min w 98°C. Próbki poddano elektroforezie białek SDS-PAGE i wizualizowano fluorescencyjnie przy użyciu urządzenia Amersham Imager 600 (GE Healthcare). W przypadku reakcji klik z azydkiem biotyny białka wytrącono metanolem, a osad rozpuszczono w 4% SDS i sonikowano przy użyciu sonikatora Bioruptor Plus (6 \times 15 sek. / 30 sek. przerwy lub do uzyskania klarownego roztworu). Następnie próbki rozcieńczono PBS do końcowego stężenia SDS 0,4%. Na tym etapie pobrano 5% na próbki wejściowe (input), które zmieszano z buforem Laemmli'ego z 100 mM DTT, zdenaturowano przez 5 min w 98°C i przechowywano do czasu elektroforezy SDS-PAGE. Białka znakowane OP-puro-biotyną zostały wzbogacone na kulkach Dynabeads ze streptawidyną (MyOne; Invitrogen) wstępnie płukanych w 0,4% SDS w PBS. Próbki inkubowano z kulkami streptawidyny przez 1 godzinę w RT, a następnie w 4°C przez noc. Następnie próbki przemyto roztworami w następującej kolejności: 3 \times 0,2% SDS w PBS, 2 \times bufor z mocznikiem (8 M mocznik, 100 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl) i 2 \times PBS. Białka eluowano w buforze Laemmli'ego zawierającym 100 mM DTT i 2,5 mM biotyny przez 10 min w 98°C i nowo zsyntetyzowane białka wizualizowano metodą Western blot z przeciwciałami wykrywającymi fragmenty NLGN1, NLGN2 i NLGN3 (Synaptic Systems, jak powyżej).

3.19. Analiza statystyczna

Liczba myszy lub powtórzeń biologicznych (w przypadku pierwotnych hodowli komórek nerwowych) użytych w każdym doświadczeniu i branych pod uwagę w celu dokonania obliczeń jest wskazana na każdej rycinie oraz w tekście. Wszystkie dane na wykresach podano jako wartości średnie \pm błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean, SEM) z technicznych powtórzeń niezależnych eksperymentów lub myszy. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono w programie GraphPad Prism wersji 7.03 (GraphPad Software Inc). Nazwy testów statystycznych użytych do analiz są wymienione w tekście pod każdą ryciną.

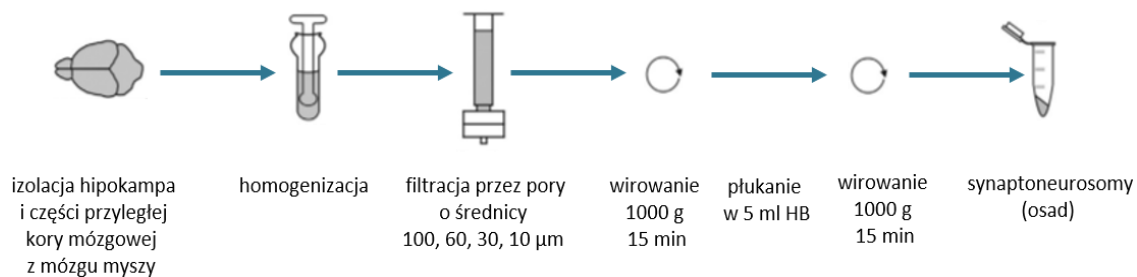
4. Wyniki

4.1. Charakterystyka zastosowanych modeli badawczych – synaptoneurosomów i pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych

Celem mojego projektu doktorskiego była analiza regulacji ekspresji ważnych białek synaptycznych – neuroligin, dlatego do badań wykorzystano synaptoneurosomy. Synaptoneurosomy, zwane też „synapsami *in vitro*” stanowią izolowaną z mózgu frakcję subkomórkową zawierającą oderwane kolce dendrytyczne (część postsynaptyczna) i zakończenia aksonów (część presynaptyczna). Udowodniono, że wyizolowane z mózgu synaptoneurosomy zachowują w pełni swoje funkcje synaptyczne, takie jak zdolność do uwalniania neurotransmiterów, aktywacji receptorów i odpowiedzi na stymulację synaptyczną, dzięki czemu syntetyzują nowe białka w procesie lokalnej translacji synaptycznej (Verity, Brown, and Cheung 1980; Gambetti et al. 1972; Kuzniewska et al. 2020; Weiler et al. 1997). Niedawno nasz zespół badawczy opublikował szczegółowy protokół izolacji synaptoneurosomów (Kuzniewska et al. 2018).

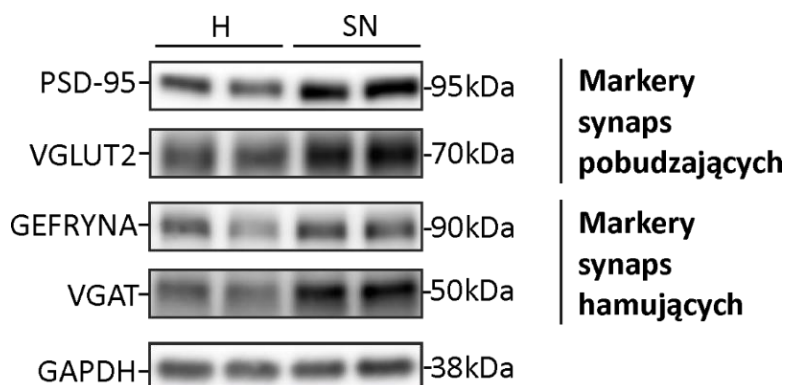
Synaptoneurosomy do badań izolowano z obu półkul mózgu ze struktury hipokampa oraz części przyległej do niego kory mózgowej, żeby zachować synaptyczne połączenia hipokampalno-korowe (Rycina 1). Analiza ekspresji białek neuroligin w synapsie została przeprowadzona z użyciem tej konkretnej części mózgu, ponieważ hipokamp jest niezwykle ważną strukturą odpowiedzialną za tak kluczowe procesy jak uczenie się oraz pamięć (Yavas, Gonzalez, and Fanselow 2019). Zespół łamliwego chromosomu X charakteryzuje się obniżeniem poziomu intelektualnego różnego stopnia, co wskazuje, iż w tej strukturze mózgu może występować nieprawidłowa ekspresja białek. Szereg opublikowanych badań potwierdza tę tezę (Banerjee et al. 2018).

Najpierw wykonano analizę porównawczą wzbogacenia poziomu białek synaptycznych w synaptoneurosomach w stosunku do homogenatów wyizolowanych z hipokampa i przyległej części kory mózgowej myszy o genotypie dzikim. Procedurę izolacji synaptoneurosomów przeprowadzono jak przedstawiono na poniższym schemacie (Rycina 16).



Rycina 16. Schemat izolacji synaptoneurosomów z mózgu myszy.

Następnie za pomocą metody Western blot oznaczono poziom białek ulegających ekspresji w synapsach pobudzających (PSD-95 – strukturalne białko gęstości postsynaptycznej i VGLUT2 – pęcherzykowy transporter glutaminianu) oraz hamujących (GEFRYNA – strukturalne białko gęstości postsynaptycznej, VGAT – pęcherzykowy transporter kwasu GABA). Poziom białka GAPDH (dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego uczestniczącej w glikolizie) stanowił kontrolę równej ilości białka nałożonego na żel. Zaobserwowano, iż w porównaniu do homogenatu (H) z mózgu myszy, synaptoneurosomy (SN) są frakcją wzbogaconą w białka synaptyczne charakterystyczne zarówno dla synaps pobudzających jak i hamujących (Rycina 17). Ponadto, ten model badawczy jest z powodzeniem stosowany przez nasz zespół badawczy, o czym świadczą opublikowane prace (Dziembowska et al. 2012; Janusz et al. 2013; Jasinska et al. 2016; Kuzniewska et al. 2018; Chmielewska et al. 2019; Kuzniewska et al. 2020).



Rycina 17. Charakterystyka izolowanych frakcji – homogenatów i synaptoneurosomów – za pomocą metody Western blot. W porównaniu do homogenatu (H) z mózgu myszy WT, synaptoneurosomy (SN) są frakcją wzbogaconą w białka synaptyczne charakterystyczne dla synaps pobudzających (PSD-95, VGLUT2) oraz hamujących (GEFRYNA, VGAT). PSD-95 – białko gęstości postsynaptycznej-95; VGLUT2 – pęcherzykowy transporter glutaminianu 2; GEFRYNA – białko gęstości postsynaptycznej synaps hamujących, VGAT – pęcherzykowy transporter kwasu GABA;

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, enzym glikolizy, kontrola równej ilości białka w żelu.

Poza synaptoneurosomami, drugim modelem wykorzystywanym w badaniach były pierwotne hodowle neuronalne. Hodowle komórek nerwowych były zakładane z hipokampa osesków szczurzych o genotypie dzikim oraz osesków myszy WT i pozbawionych ekspresji genu *Fmr1* (*Fmr1* KO). Hodowle prowadzono przez 19-21 dni *in vitro*, a następnie dojrzałe komórki nerwowe wykorzystywano do oceny poziomu ekspresji neuroligin. Hodowle neuronów hipokampalnych są rzetelnym modelem uzupełniającym i potwierdzającym wyniki uzyskane w synaptoneurosomach.

4.2. Ocena poziomu ekspresji neuroligin w mózgu myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO

W ramach projektu doktorskiego weryfikowano hipotezę badawczą czy białko FMRP reguluje translację mRNA neuroligin. W tym przypadku brak białka FMRP w zespole łamliwego chromosomu X skutkowałby podwyższonym poziomem białka neuroligin w synapsach. Powyższa hipoteza została wstępnie zweryfikowana przez nasz zespół badawczy, który we współpracy z laboratorium prof. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego przeprowadził analizy proteomiczne metodą spektrometrii mas mające na celu ilościowe porównanie poziomu białka neuroligin 1, 2 i 3 w synaptoneurosomach pomiędzy genotypami myszy WT i *Fmr1* KO zarówno w stanie podstawowym, jak i po aktywacji synaptycznej (dane nieopublikowane). Zgromadzone dane wskazywały, że poziom ekspresji neuroligin może być znacznie zaburzony w przypadku braku białka FMRP.

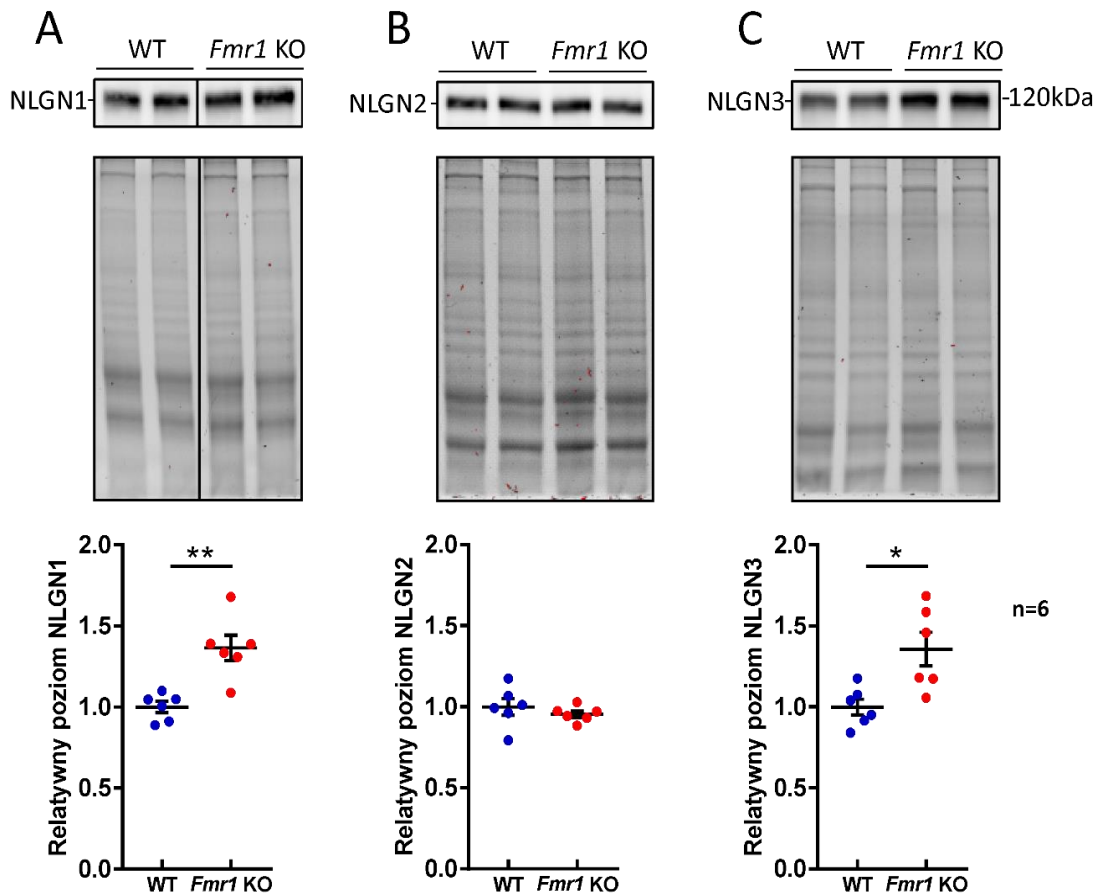
Uzyskane wyniki stanowiły jedną z kluczowych przesłanek do przeprowadzenia dokładnej analizy poziomu neuroligin w synapsie z użyciem metod molekularnych, co stanowi tematykę badań zawartych w niniejszej pracy doktorskiej.

4.2.1. Porównanie poziomu białka neuroligin 1, 2 i 3 w synaptoneurosomach izolowanych z myszy typu dzikiego i *Fmr1* KO

W celu porównania poziomu białka neuroligin w synaptoneurosomach myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO zastosowano metodę Western blot. W serii niezależnych eksperymentów wyizolowano synaptoneurosomy z mózgów myszy WT i *Fmr1* KO, zmierzono poziom białka w każdej próbce za pomocą testu BCA, a następnie przeprowadzono elektroforezę białek SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym. Po przeniesieniu białek z żelu na membranę PVDF i zablokowaniu miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał, inkubowano membranę z przeciwciałami pierwszorzędowymi, płukano i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi. Poziom białka dla każdej z izoform neuroligin zwizualizowano za pomocą metody chemiluminescencji. Intensywność pikseli w poszczególnych prążkach obliczono densytometrycznie używając programu ImageJ, a otrzymane wartości wraz z przykładowymi zdjęciami obrazującymi poziom białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 przedstawiono na rycinie 18. Analizy statystyczne wszystkich wyników uzyskanych w projekcie doktorskim przeprowadzono w programie GraphPad Prism.

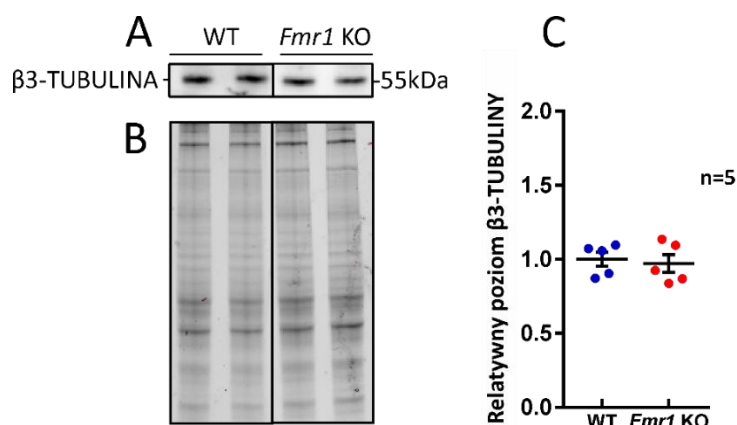
Dla każdej analizy Western blot przeprowadzonej w niniejszym projekcie doktorskim prowadzono kontrolę równej ilości białka nałożonego na żel oraz wydajności transferu obrazując żel przed i po przeniesieniu białek za pomocą systemu do wizualizacji żeli Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Środkowy panel na rycinie 18 prezentuje wizualizację żeli TGX przed przeniesieniem białek na membranę i detekcją z użyciem przeciwciał (Rycina 18).

Western blot - poziom białka w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO



Rycina 18. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomego białka (**A**) NLGN1, (**B**) NLGN2 i (**C**) NLGN3 w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. Ogólny poziom białka w żelu TGX był zwizualizowany przed przeniesieniem białek na membranę. Wykresy przedstawiają uzyskane wartości \pm SEM z obliczeń densytometrycznych w programie ImageJ, n=6 myszy/genotyp, NLGN1 $p=0,0016$ (** $p < 0,01$); NLGN2 $p=0,4293$ (nieistotne, $p > 0,05$); NLGN3 $p=0,0112$; (* $p < 0,05$) obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta.

Ponadto, analizowano poziom białka β 3-TUBULINY, który powinien być taki sam w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO, co stanowiło dodatkową kontrolę eksperymentów (Rycina 19). Tubuliny α i β są białkami tworzącymi mikrotubule, a izoforma β 3-tubuliny jest specyficzna dla neuronów i nie ulega ekspresji w astrocytach. Po inkubacji z przeciwciałem pojedynczy prążek był zlokalizowany na wysokości około 55 kDa, co jest zgodne z oczekiwaną masą molekularną β 3-TUBULINY w próbkach synaptoneurosomów.

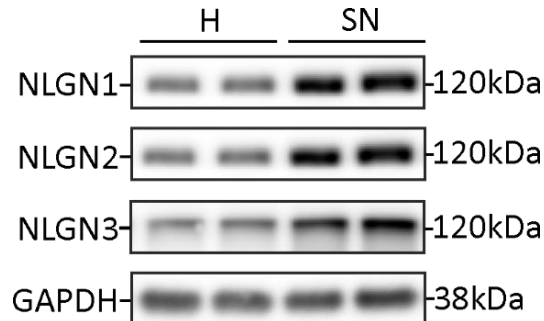


Rycina 19. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz (C) obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomego białka β 3-TUBULINY w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. Wykres przedstawia uzyskane wartości \pm SEM z obliczeń densytometrycznych, n=5 myszy/genotyp, p=0,7223 (nieistotne, p > 0,05) obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów dowiedziono, że poziom białka NLGN1 oraz NLGN3 jest podwyższony w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO w porównaniu z synaptoneurosomami myszy o genotypie dzikim (36% wzrost poziomu białka NLGN1, p=0,0016, t=4,3, df=10 i 36% wzrost poziomu białka NLGN3, p=0,0112, t=3.101, df=10 obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, n=6; rycina 18). W powyższej analizie nie zaobserwowano różnicy w poziomie białka NLGN2 (p=0,4293, t=0,824, df=10 obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, n=6; rycina 18) oraz kontrolnej β 3-TUBULINY (p=0,7223, t=0,3681, df=8 obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, n=5; rycina 19).

W przeprowadzonej metodą Western blot analizie nie wykryto różnic w poziomie białka NLGN2 w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. Jak wspomniano wcześniej, analizowane białka NLGN1, NLGN2 i NLGN3 ulegają ekspresji zarówno w synapsach pobudzających (NLGN1, NLGN3), jak i hamujących (NLGN2, NLGN3). Postuluje się, że w mysim mózgu jest mniej synaps hamujących niż pobudzających (Megias et al. 2001). W celu sprawdzenia czy białka neuroligin są równocześnie wzbogacone w preparacie synaptoneurosomów w stosunku do homogenatów mózgu myszy przeprowadzono analizę Western blot (Rycina 20). Jak pokazano na rycinie 20, białka wszystkich neuroligin są wzbogacone w synaptoneurosomach w porównaniu do homogenatów mózgu myszy niezależnie od typu

synaps, na których występują. Nawet jeśli w mózgu myszy jest mniej synaps hamujących (zawierających NLGN2) to jest ich równie mniej w synaptoneurosomach, co przedstawia również rycina 20.

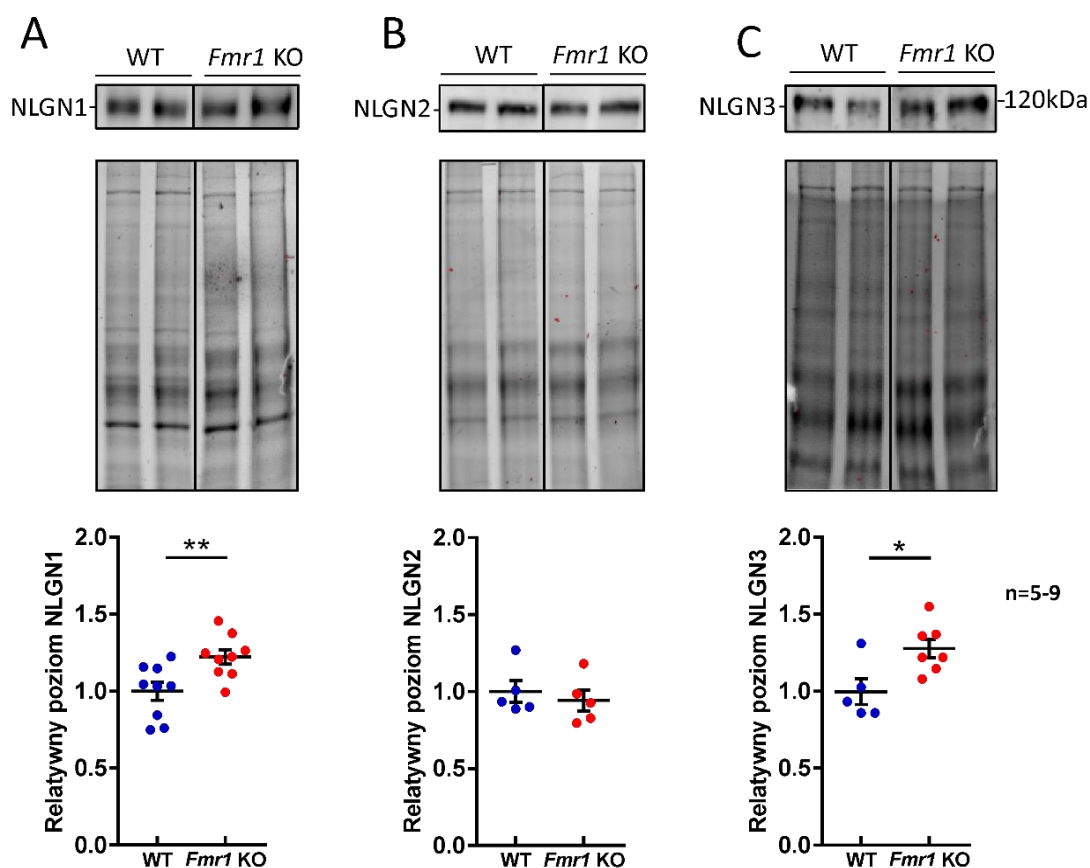


Rycina 20. Analiza wzbogacenia białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 w synaptoneurosomach za pomocą metody Western blot. W porównaniu do homogenatu (H) z mózgu myszy WT, synaptoneurosomy (SN) są frakcją wzbogaconą w białka neuroligin, które mają masę molekularną około 120 kDa. GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, enzym glikolizy, kontrola równej ilości białka o masie molekularnej 38 kDa.

4.2.2. Porównanie poziomu białka neuroliginy 1, 2, 3 w pierwotnej hodowli neuronalnej z myszy typu dzikiego oraz *Fmr1* KO

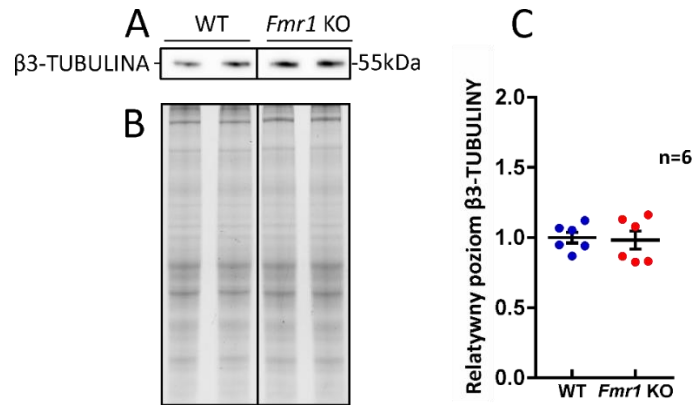
Analogiczne analizy przeprowadzono z użyciem ekstraktów białkowych pochodzących z pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych założonej z myszy o genotypie dzikim oraz *Fmr1* KO. Hodowle neuronów hipokampalnych były prowadzone przez 21 dni *in vitro*, a następnie komórki poddano lizie, pomiarowi białka za pomocą testu BCA oraz elektroforezie SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym. Detekcję białek neuroligin przeprowadzono z użyciem specyficznych przeciwciał i metody chemiluminescencji, a wartości otrzymane w wyniku obliczeń densytometrycznych w programie ImageJ zostały przedstawione na rycinie 21.

Western blot - poziom białka w hodowlach neuronów hipokampalnych WT i *Fmr1* KO



Rycina 21. Analiza Western blot, kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu białka (**A**) NLGN1, (**B**) NLGN2, (**C**) NLGN3 w neuronach hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli założonej z osesków myszy WT i *Fmr1* KO. Ogólny poziom białka w żelu TGX był zwizualizowany przed przeniesieniem białek na membranę. Wykresy przedstawiają uzyskane wartości \pm SEM z obliczeń densytometrycznych, n=5-9 myszy/genotyp, NLGN1 p=0,0086 (** p < 0,01); NLGN2 p=0,577 (nieistotne, p > 0,05); NLGN3 p=0,0189; (* p < 0,05) obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta.

Przedstawiona na rycinie 21 wizualizacja poziomu białka w żelu TGX przed przeniesieniem na membranę stanowiła kontrolę równej ilości białka nałożonego na żel. Dodatkową kontrolą była analiza poziomu β 3-TUBULINY – specyficznego dla neuronów białka tworzącego mikrotubule (Rycina 22).



Rycina 22. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX oraz (C) obliczenia densytometryczne poziomu białka β -TUBULINY w neuronach hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli założonej z mózgowi myszy WT i *Fmr1* KO. Wykres przedstawia wartości średnie \pm SEM z obliczeń densytometrycznych, n=6 myszy/genotyp, p=0,822 (nieistotne, p > 0,05) obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta.

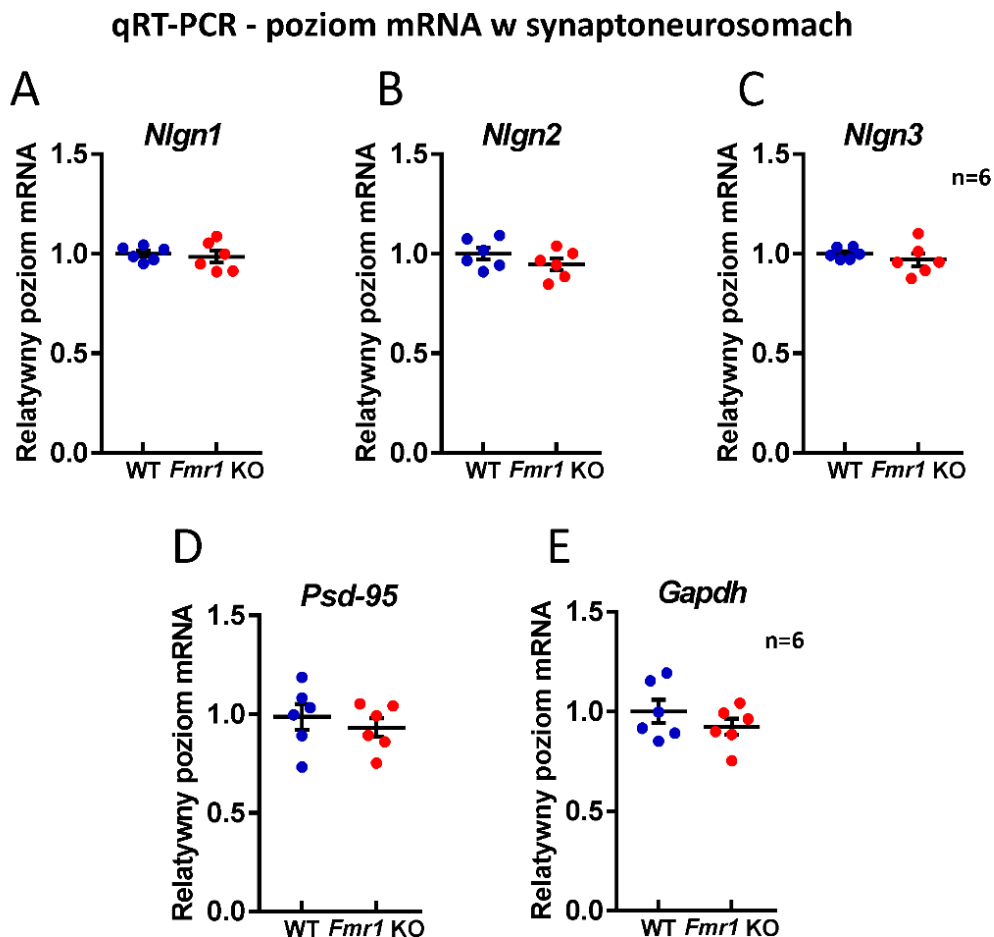
W przypadku hodowli neuronalnych również zaobserwowano zwiększony poziom synaptycznych białek NLGN1 i NLGN3 w neuronach pochodzących z myszy *Fmr1* KO w porównaniu z WT (22% wzrost poziomu białka NLGN1, p=0,0086, t=2,992, df=16 i 28% wzrost poziomu białka NLGN3, p=0,0189, t=2,796, df=10 obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, n=5-9; rycina 21). Ponownie nie wykryto różnic w poziomie NLGN2 i β -TUBULINY pomiędzy dwoma analizowanymi genotypami (NLGN2: p=0,5774, t=0,5807, df=8 i β -TUBULINY: p=0,822, t=0,2309, df=10 obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, n=6; rycina 21 i 22).

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych analiz wskazywały, że poziom białka NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w synaptoneurosomach i pierwotnych neuronach hipokampalnych z myszy *Fmr1* KO w porównaniu do myszy o genotypie dzikim.

4.2.3. Porównanie poziomu mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w synaptoneurosomach z myszy typu dzikiego oraz *Fmr1* KO

Następnie porównano poziom mRNA *Nlgn* w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy typu dzikiego i *Fmr1* KO. Po izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji próbki poddano reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Przedstawiony na rycinie 23 wynik wskazuje na brak różnic w poziomie mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* pomiędzy analizowanymi genotypami (*Nlgn1*: p=0,6581, t=0,4561, df=10, *Nlgn2*: p=0,2299,

$t=1,279$, $df=10$, *Nlgn3*: $p=0,395$, $t=0,8887$, $df=10$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 23). Taki sam poziom mRNA w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO wykryto również dla transkryptu *Psd-95* i *Gapdh* (*Psd-95*: $p=0,5109$, $t=0,6818$, $df=10$; *Gapdh*: $p=0,3021$, $t=1,088$, $df=10$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 23).



Rycina 23. Porównanie poziomu mRNA (A) *Nlgn1*, (B) *Nlgn2*, (C) *Nlgn3*, (D) *Psd-95* (kontrola pozytywna) oraz (E) *Gapdh* (kontrola negatywna) w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM. Analiza za pomocą niesparowanego testu t-Studenta nie wykazała różnic, $n=6$ myszy/genotyp (nieistotne, $p > 0,05$).

W powyższych eksperymentach wykryto brak zmian w poziomie mRNA w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO oraz jednoczesny podwyższony poziom białka neuroligin. Uzyskane dane dowodzą, że w zespole łamliwego chromosomu X proces translacji neuroligin jest zaburzony w wyniku braku

białka FMRP, co skutkuje podwyższoną lokalną syntezą białka NLGN1 i NLGN3 w synapsie.

4.3. Ocena oddziaływania białka FMRP z mRNA neurologin

4.3.1. Identyfikacja sekwencji tworzących G-kwartet w mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*

FMRP jest białkiem wiążącym RNA, odpowiedzialnym za regulację lokalnej translacji wielu ważnych transkryptów synaptycznych. Jak opisano powyżej, białko FMRP wiąże się z docelowym RNA za pomocą domeny RGG box. Z kolei RNA musi zawierać w sekwencji kilka par guaniny (G), które są konieczne do utworzenia drugorzędowej struktury tetrad guaninowych (zwanych G-kwartetem lub G-kwadrupleksem) wiązanej przez białko FMRP (Darnell et al. 2011; Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005; Chen and Joseph 2015; Dahlhaus and El-Husseini 2010).

W celu identyfikacji sekwencji, które potencjalnie mogą tworzyć strukturę G-kwadrupleksu w ludzkich, mysich i szczurzych transkryptach *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* (pobranych z bazy danych <http://www.ensembl.org/index.html>) przeprowadzono analizę *in silico* z użyciem programu QGRS Mapper (<https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analize.php>) (Kikin, D'Antonio, and Bagga 2006). Wyniki wskazały na występowanie wielu takich miejsc w sekwencji transkryptów trzech neurologin w trzech analizowanych organizmach: u ludzi, myszy i szczurów. Przykładowo, w szczurzej sekwencji transkryptu *Nlgn1* zidentyfikowano 18 sekwencji bogatych w G, 32 sekwencje dla *Nlgn2* oraz 19 sekwencji dla *Nlgn3* (Tabela 10).

Sekwencje bogate w guaninę są zlokalizowane zarówno w sekwencjach regulatorowych 5' UTR, sekwencji kodującej genu (CDS) oraz 3' UTR transkryptów neurologin, co jest zgodne z opublikowanymi wcześniej badaniami (Darnell et al. 2011). Równocześnie przeprowadzone przyrównanie szczurzej sekwencji do transkryptów mysich i ludzkich za pomocą programu Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) ujawniło, że sekwencje tworzące strukturę G-kwartetu występują często w miejscach zachowanych w ewolucji pomiędzy gatunkami, co może mieć znaczenie przy wyciąganiu wniosków z badań i ekstrapolacji wyników na sekwencje mysie i ludzkie.

Nazwa genu	Nazwa szczurzego transkryptu w bazie ensembl	Długość transkryptu (pz)	Długość białka (aa)	Liczba sekwencji bogatych w G
<i>Nlgn1</i>	Nlgn1-201 ENSRNOT00000092660.1	5187	843	18
<i>Nlgn2</i>	Nlgn2-201 ENSRNOT00000056872.5	3976	834	32
<i>Nlgn3</i>	Nlgn3-201 ENSRNOT00000005077.5	3221	848	19

Tabela 10. Liczba sekwencji bogatych w guaninę tworzących strukturę G-kwartetu w szczurzych transkryptach *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* zidentyfikowanych za pomocą programu QGRS Mapper (<https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analize.php>). Parametry wyszukiwania w programie QGRS Mapper: Maksymalna długość QGRS: 30; Minimalna wielkość zgrupowań G: 2; wielkość pętli: 0 do 36. Pz – liczba par zasad (nukleotydów), aa – sekwencja aminokwasowa.

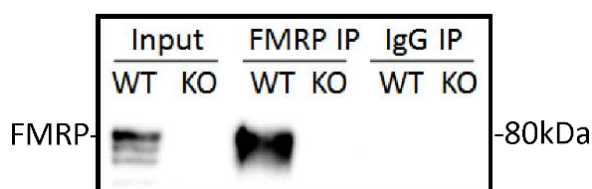
Podsumowując, przeprowadzone *in silico* analizy wskazywały na występowanie w mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* wielu sekwencji bogatych w guaninę, które są zdolne utworzyć drugorzędową strukturę G-kwartetu i potencjalnie mogą być wiązane przez białko FMRP.

4.3.2. Zbadanie oddziaływania białka FMRP z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO

W momencie rozpoczęcia projektu badawczego opublikowane były jedynie dwie prace sugerujące oddziaływanie białka FMRP z transkryptami neurologin (Dahlhaus and El-Husseini 2010; Darnell et al. 2011). Niemniej jednak uzyskane dane były ze sobą sprzeczne. Wyniki doświadczeń z użyciem metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA po sieciowaniu promieniami UV i współwytrącaniu RNA (HITS-CLIP) wskazały, że wśród 842 zidentyfikowanych (istotnych statystycznie) transkryptów białko FMRP może oddziaływać z mRNA *Nlgn2* i *Nlgn3* (Darnell et al. 2011). Te doświadczenia były przeprowadzone na połączonych homogenatach z całej kory mózgowej i mózdzku myszy w wieku P11-P25 (Darnell et al. 2011). Inne opublikowane badania wskazały na interakcję białka FMRP z mRNA *Nlgn1* i *Nlgn2* (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Te dane zostały uzyskane metodą współwytrącania RNA z ekstraktów całego mózgu dorosłych myszy WT i *Fmr1* KO w wieku 2,5-6 miesięcy. W tym przypadku wyniki przedstawiono w postaci prążków na żelu po reakcji

odwrotnej transkrypcji i PCR (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Biorąc pod uwagę specyfikę zależności biologicznych w poszczególnych częściach mózgu, fakt, iż powyższe dane zostały uzyskane ze wspólnych ekstraktów kilku struktur mózgu, zmniejsza wiarygodność tych wyników.

Aby zbadać oddziaływanie białka FMRP z mRNA neuroligin w synapsach użyto bardziej specyficznego modelu – synaptoneurosomów izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. W celu zbadania interakcji białka FMRP z mRNA neuroligin zastosowano metodę współwytrącania RNA z użyciem przeciwciała anti-FMRP 7G1-1, a następnie przeprowadzono ocenę ilościową za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Specyficzność reakcji potwierdzono używając metody Western blot, żeby sprawdzić obecność białka FMRP w próbkach inkubowanych z przeciwciałem anti-FMRP (FMRP IP) lub z kontrolnymi IgG (IgG IP) (Rycina 24).



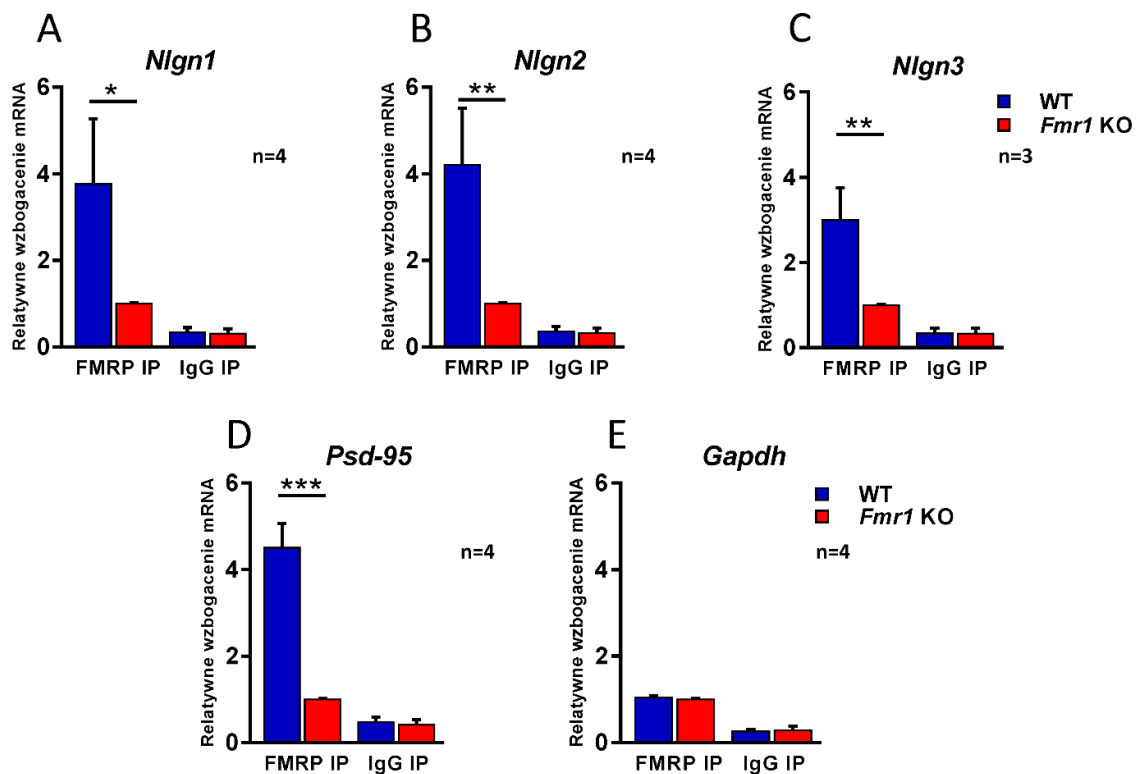
Rycina 24. Analiza Western blot pokazująca obecność białka FMRP we frakcji wejściowej (input) oraz w próbkach współwytrączanych z białkiem FMRP (FMRP IP) uzyskanych z synaptoneurosomów myszy o genotypie dzikim i brak białka FMRP w próbkach z myszy *Fmr1* KO (KO). Próbki współwytrącane z IgG (IgG IP) stanowiły negatywną kontrolę eksperymentu i wykazały obecności białka FMRP. Białko FMRP ma masę cząsteczkową około 67-80 kDa.

Na rycinie 24 przedstawiono wynik analizy Western blot, która wykazała obecność białka FMRP w próbkach synaptoneurosomów uzyskanych z myszy typu dzikiego, lecz nie w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO. W kontrolnych próbkach synaptoneurosomów, w których białka wytrącano z użyciem przeciwciała anti-IgG (IgG IP) nie stwierdzono obecności białka FMRP. Białko FMRP lokalizuje się na wysokości 67-80 kDa, co jest zgodne z oczekiwaną masą cząsteczkową tego białka (Verheij et al. 1995).

Następnie ze wszystkich próbek wyizolowano RNA i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA, którego użyto do pomiaru poziomu mRNA za pomocą ilościowej metody PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) i sond TaqMan. Uzyskane wartości przeliczono, by przedstawić na wykresie relatywne

wzbogacenie mRNA w synaptoneurosomach myszy typu dzikiego ponad poziom mRNA obecny w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO. Próbkę uzyskane po wytrącaniu RNA z przeciwciałem anti-IgG (IgG IP), stanowiące dodatkową kontrolę również były poddawane reakcji qRT-PCR i analizowane.

Wyniki obliczeń z kilku eksperymentów wykazały, że dla wszystkich izoform neuroligin następuje wzbogacenie mRNA współwytrącanego z białkiem FMRP w synaptoneurosomach myszy typu dzikiego ponad poziom mRNA obecny w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO (Rycina 25). Uzyskano następujące wyniki dla *Nlgn1*: 2,77-krotny wzrost $p=0,0239$, $t=2,583$, $df=12$; dla *Nlgn2*: 3,2-krotny wzrost, $p=0,0051$, $t=3,415$, $df=12$; dla *Nlgn3*: 2-krotny wzrost $p=0,0067$, $t=3,629$, $df=8$ poziomu mRNA w synaptoneurosomach WT FMRP IP w porównaniu do *Fmr1* KO FMRP IP. Analizę statystyczną wyników tych eksperymentów przeprowadzono za pomocą one-way ANOVA z testem wielokrotnych porównań Sidaka.



Rycina 25. Poziom wzbogacenia mRNA (A) *Nlgn1*, (B) *Nlgn2*, (C) *Nlgn3*, (D) *Psd-95* (pozytywna kontrola) i (E) *Gapdh* (negatywna kontrola) po współwytrącaniu z przeciwciałem anti-FMRP 7G1-1 (FMRP IP) oraz kontrolnym przeciwciałem anti-IgG (IgG IP) zmierzony metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym w synaptoneurosomach izolowanych z hipokampa oraz kory mózgowej myszy o genotypie dzikim oraz *Fmr1* KO. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, $n=3-4$

eksperymenty, 2 myszy na genotyp na eksperyment, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ obliczone za pomocą one-way ANOVA z testem wielokrotnych porównań Sidaka.

Jako pozytywnej kontroli eksperymentu użyto transkryptu *Psd-95*, którego oddziaływanie z białkiem FMRP jest potwierdzone publikacjami (Zalfa et al. 2007; Muddashetty et al. 2007). Analiza wykazała 3,51-krotny wzrost poziomu mRNA *Psd-95* w synaptoneurosomach myszy WT w porównaniu z ekstraktami uzyskanymi z myszy *Fmr1* KO; $p < 0,0001$, $t=8,413$, $df=12$, $n=4$ (Rycina 25D). Pomiar poziomu mRNA *Gapdh*, stanowiącego negatywną kontrolę doświadczenia, nie ujawnił różnic pomiędzy ekstraktami z myszy WT i *Fmr1* KO (Rycina 25E).

W wyniku powyższych doświadczeń wykazano, że białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* specyficznie w synaptoneurosomach.

4.3.3. Zbadanie współwystępowania białka FMRP z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w pierwotnej szczurzej hodowli neuronalnej

Przeprowadzone eksperymenty z użyciem metody współwytrącania RNA wykazały, że białko FMRP oddziałuje z transkryptami neurologin w synaptoneurosomach. Aby dodatkowo potwierdzić interakcję mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* z białkiem FMRP w dendrytach, przeprowadzono obrazowanie ich współwystępowania w hodowli neuronalnej (Rycina 27). W tym celu z osesków szczurzych zakładano pierwotne hodowle komórek hipokampa oraz hodowano je do 21 dnia *in vitro* (DIV21). Wizualizacja badanych cząsteczek opierała się na metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) w celu uwidocznienia mRNA neurologin połączonej z równoczesnym barwieniem fluorescencyjnym i immunodetekcją białka FMRP w neuronach.

Żeby osiągnąć zamierzony cel badawczy najpierw zaprojektowano oraz zsyntetyzowano sondy antysensowne oraz sensowne (kontrolne) do metody FISH. Sondy o długości ponad 500 nukleotydów zostały zaprojektowane do końcowego fragmentu sekwencji kodującej (CDS) genów *Nlgns* oraz początkowej części 3' UTR sekwencji szczurzej, ponieważ przeprowadzone przez mnie analizy *in silico* wskazywały na występowanie w tym regionie miejsc potencjalnej interakcji białka FMRP z mRNA wszystkich neurologin (Rycina 26). Długość poszczególnych sond do FISH wynosiła: *Nlgn1* 527 pz, *Nlgn2* 562 pz i *Nlgn3* 507 pz.

Po przeprowadzeniu procedury fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wraz z barwieniem immunofluorescencyjnym preparaty obrazowano z użyciem mikroskopu konfokalnego. Zaobserwowano, że wizualizowane na czerwono endogenne mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zlokalizowane było w jądrze i ciele neuronu oraz w dendrytach. Podobny wzór ekspresji w neuronach wykazywało wyznakowane przeciwciałem białko FMRP (kolor zielony), co wiadomo również z poprzednich doniesień (Devys et al. 1993; Feng, Gutekunst, et al. 1997).

Obserwacja komórek nerwowych przy powiększeniu na drugorzędowe dendryty ujawniła, że sygnał pozytywny dla każdej izoformy mRNA *Nlgns* wykazuje częściowe współwystępowanie z białkiem FMRP, co zostało przedstawione w postaci żółtego sygnału na nałożonych kanałach na dolnym zdjęciu ryciny 27. Kolokalizacja sygnałów pochodzących od białka FMRP i mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* została również przedstawiona w postaci wykresu intensywności fluorescencji (dolny panel ryciny 27).

Analogicznie przeprowadzone eksperymenty z użyciem kontrolnych sond sensownych wykazały brak specyficznego sygnału dla mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* (Rycina 28). Sondy sensowne zostały zaprojektowane do tej samej sekwencji co sondy antysensowne i miały tę samą długość. Sondy sensowne nie wizualizują granul RNA, lecz mogą jedynie tworzyć niespecyficzne skupienia barwnika, dlatego zostały użyte jako kontrola eksperymentu.

A Sekwencja sondy NLGN1 z zaznaczonymi sekwencjami bogatymi w G (527 pz)

CACTCGAACT TTGGCTCACC TACATACTTC TATGCCTTTT ATCATCATTG CCAAAACAGAC CAAGTCCAG CTTGGGCTGA TGCAGCTCAT **GGGGATGAGG**
TTCCCTATGT ATTGGGAATC CCCATGATTG GOCCTACAGA GTTATTTCCT TGCAATTTCT CCAAGAATGA TGTGATGTTG AGTGTGTAG TAATGACATA
 CTGGACGAAT TTGTGTAARA CCGGTGACCC AAATCACCAC GTTCCCTAAG ACACAAAATT CATTTCATAC AAACCCACCC GCTTTGAGA AGTAGCATGG
 ACCAGATATT CCAGAAAAGA CCAACTTTAT TCCTCATATTG GATTAAAACC GAGAGTTAAA GAACATTACA GAGCCAAATA **GGTAAATCTC TGGTTGGAGC**
TGGTACCTCA TGTGCATAAT CTCRAATGACA TTTCTCAGTA TACCTCGACA ACAACTAAG TGCCATCAAC AGACATCACT CTCAGACCTA CAAGAAAAA
 TTCCACTCCA GTCACATCAG CTTTTC

pozycja w sondzie NLGN1 do FISH	dlugość	sekwencja bogata w G	ranga
91	25	GGGGATGAGGTTCCCTATGTATTGG	8
381	23	GGTAAATCTCTGGTTGGAGCTGG	14

B Sekwencja sondy NLGN2 z zaznaczonymi sekwencjami bogatymi w G (562 pz)

TCCGCCAGAC ACAGATAICC GGGACTCTGG GAAGAAACCA GTCATGCTGT TTCTACACGG **GGCTCCTAC ATGGAGGGCA CCGG**AAACAT GTTCGACGGC
 TCAGTCCTGG CTGCCTAIGG CAATGTCAIC GTAGCCACAC TCAACTACCG TCTT**GGGGTG CTGGCTTTC TCAGCACTGG** TGACCA**GGCT** GCAAAAGGCA
ACTACGGGCT CCTGGACCAG ATCCAGGCC TGCCTGGCT CAGTGAARAC ATTGCCCACT TTGGCGGTGA CCTGAAACGC ATCACCATCT TTG**GGTCTGG**
TCCGGGGCC TCCTGTGTCA ACTTGTCTGAT COTCTCCAC CATTGAAAG GGCTGTCCA GAAGGCCATT GCTCAGAGTG GCACCTCCAT TTCCAGCTGG
 TCTGTCAACT ACCAGCCGCT CRAAGTACAG CCGCTGCTGG CAGCCAAAGT GGCTGTGAC CGAGAGGACA GCACGGAAGC TGTGGAAATG CTACGCCGGA
 AGTCTTCCCG GGAGTAGTA GACCAGSATG TGCAGCTGC CCGCTACCAC ATTGCCTTTG GG

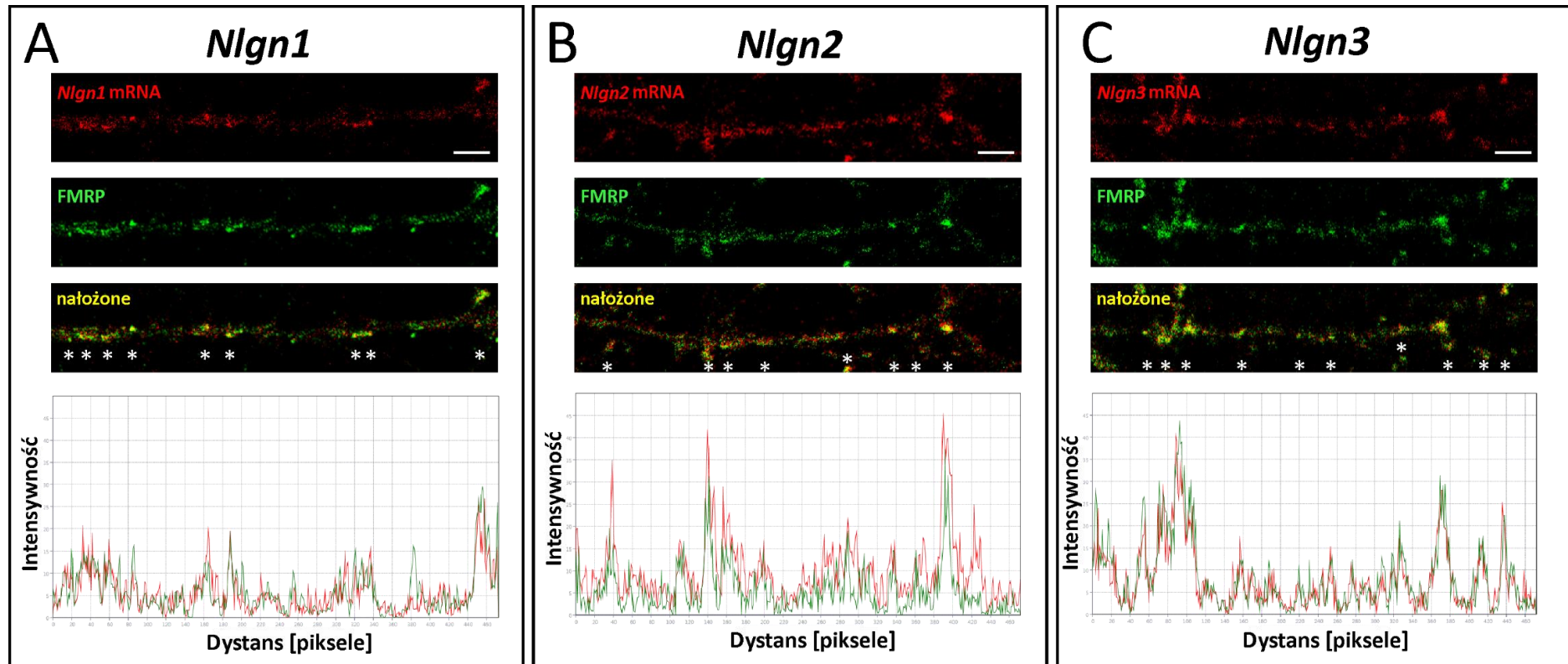
pozycja w sondzie NLGN2 do FISH	dlugość	sekwencja bogata w G	ranga
62	24	GGCTCCTACATGGAGGGCACCGGG	14
155	26	GGGGTGCTCGGCTTTCTCAGCACTGG	8
187	29	GGCTGCAAAAAGGCAACTACGGGCTCCTGG	19
294	15	GGTCTGGTGCGGGGG	19

C Sekwencja sondy NLGN3 z zaznaczonymi sekwencjami bogatymi w G (507 pz)

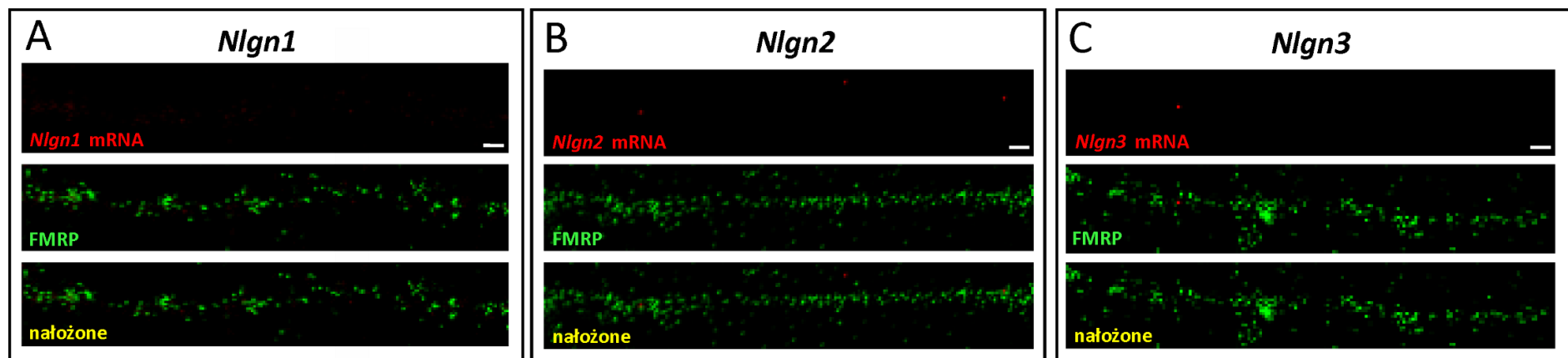
AGCTCTACCT TCACATCGGG CTGAARCCAA GGTTCTGTA TCATTACCGA GCCACAAAG TAGCCITTTG GAAGCACCTG GTACCCCATC TGTACAACT
 GCATGACATG TTCCACTATA CATCCACGAC CACGAAAGTG CCGCCGCGG ACACCACCCA TAGCTCCAC ATCACCCGTA GGCCCAACCG CAAGACCTGG
 AGCACCAGA GACCAGCCAT CTCACCTGCC TACAGCAATG AGAATGCTCC TG**GGTCTCTGG** **AATGGGGACC** **AGG**ATGCAGG GCCACTCCTG GTCGAGAACC
 CTCGAGACTA CTCACCTGAA TTAAGTGTCA CCATGCTGT TGGGGCTCT CTCTGTTC TCAATGTGT GGCTTTGCT GCTCTCTATT ACCGTAA**GGG**
CAAACGGGCGC CAGGAGCCCC TGAGGCAGCC TAGCCCCAA AGGGAACTG GTGCCCCAGA ATTG**GGAACT** **GCTCCAGAGG** **AGGAGCTGGC** AGCATTACAG
 TTGGGTC

pozycja w sondzie NLGN3 do FISH	dlugość	sekwencja bogata w G	ranga
253	21	GGTCTCTGGAATGGGGACCAGG	20
398	28	GGACAAACGGCGCCAAGGAGCCCCTGAGG	17
465	25	GGAAGTCTCCAGAGGAGGAGCTGG	10

Rycina 26. Wyniki analiz *in silico* przeprowadzonych za pomocą programu QGRS Mapper w celu wyszukania sekwencji bogatych w G. Zaznaczono sekwencje bogate w guaninę tworzące strukturę G-kwartetu w regionie szurzej sekwencji kodującej genu (CDS) i 3' UTR transkryptów (A) *Nlgn1*, (B) *Nlgn2*, (C) *Nlgn3* użytych do zaprojektowania sond do FISH. Parametry wyszukiwania w programie QGRS Mapper: Maksymalna długość QGRS: 30; Minimalna wielkość zgrupowań G: 2; wielkość pętli: 0 do 36.



Rycina 27. Fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja z użyciem antysensownych sond dla (A) *Nlgn1*, (B) *Nlgn2*, (C) *Nlgn3* mRNA oraz immunofluorescencyjne barwienie białka FMRP wykazuje częściowe współwystępowanie (oznaczono białą gwiazdką) mRNA wszystkich neuroligin (sygnał w postaci czerwonych granul) z białkiem FMRP (sygnał w postaci zielonych granul) w dendrytach szczurzych neuronów hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli. Na wykresie poniżej wspólnie przedstawiono intensywność fluorescencji dla sygnałów pochodzących od białka FMRP i mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3*. Skala 5 μ m.



Rycina 28. Fluorescencyjna *in situ* hybrydyzacja z użyciem sensownych (kontrolnych) sond dla (A) *Nlgn1*, (B) *Nlgn2*, (C) *Nlgn3* mRNA oraz immunofluorescencyjne barwienie białka FMRP prezentuje brak specyficznego sygnału dla mRNA neurologin w dendrytach szczurzych neuronów hipokampalnych w 21 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli. Sonda sens nie uwidacznia granul RNA, lecz może tworzyć niespecyficzne skupienia barwnika. Skala 5 μ m.

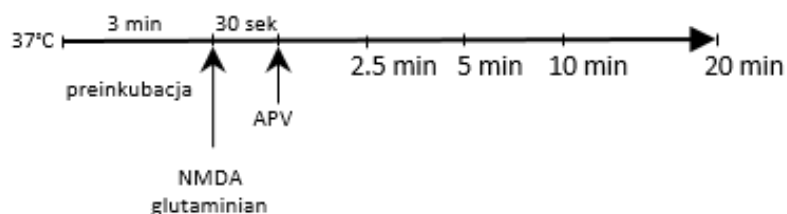
Podsumowując, wyniki powyższych doświadczeń wskazywały, że białko FMRP może oddziaływać z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zarówno w synaptoneurosomach jak i w dendrytach, co sugerowało, że białko FMRP może regulować translację mRNA neuroligin, a zatem również poziom tych białek w synapsie.

4.4. Charakterystyka zależnej od aktywności dystrybucji neuroligin w synapsie – wzmożone kierowanie białek NLGN1 i NLGN3 na błonę postsynaptyczną myszy *Fmr1* KO

Neuroliginy funkcjonują na błonie postsynaptycznej zarówno jako homodimery jak i heterodimery (Poulopoulos et al. 2012). Proces dimeryzacji neuroligin następuje w systemie pęcherzyków przed ich kierowaniem na powierzchnię komórki (Comoletti et al. 2003; Budreck and Scheiffele 2007). W poprzednich eksperymentach zaobserwowano podwyższony poziom całkowitej ilości białek NLGN1 i NLGN3 w synapsie myszy *Fmr1* KO w porównaniu z synapsami myszy WT. Na tym etapie badań pojawiło się pytanie: w jakiej części synapsy poziom NLGN jest podwyższony? Na powierzchni błony postsynaptycznej czy wewnątrz synapsy?

Żeby odpowiedzieć na to pytanie badawcze przeprowadzono charakterystykę zależnej od aktywności synaptycznej lokalizacji neuroligin w synapsie. Użyto chemicznego sieciowania białek zewnątrzkomórkowych – metody pozwalającej na utrwalenie białek, które występują w błonie bardzo blisko siebie na przykład tworząc dimery. Najpierw, przeprowadzono stymulację receptorów NMDA w synaptoneurosomach z myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą opisanego wcześniej protokołu stymulacji (Kuzniewska et al. 2020; Dziembowska et al. 2012; Scheetz, Nairn, and Constantine-Paton 2000). Schemat postępowania prowadzący do aktywacji synaptycznych receptorów NMDA w synaptoneurosomach przedstawiono na rycinie 29.

Schemat stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach

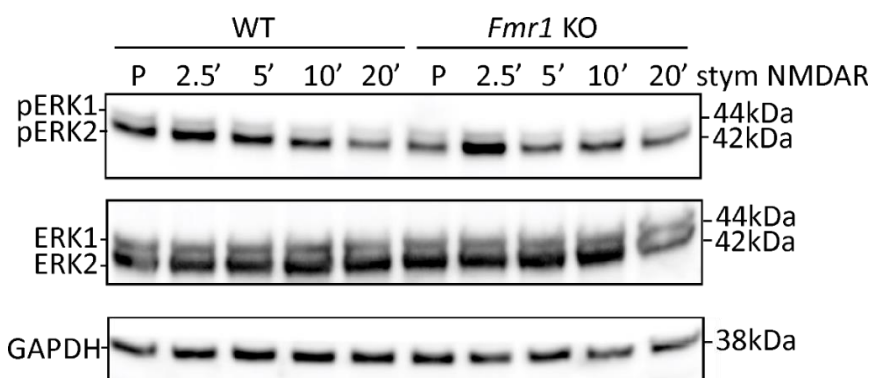


Rycina 29. Schemat stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach stosowanej w celu wywołania aktywacji synaptycznej.

Świeżo izolowane synaptoneurosomy były wstępnie ogrzewane w 37°C przez 3 minuty z wytrząsaniem. Następnie dodawano NMDA (stężenie końcowe 50 µM) i glutaminian (stężenie końcowe 10 µM) na 30 sekund, po czym stymulację receptorów NMDA przerywano za pomocą inhibitora NMDA – APV (kwas DL-2-amino-5-fosfonowalerianowy, stężenie końcowe 120 µM). Inkubację tak stymulowanych próbek prowadzono przez 2,5, 5, 10 i 20 minut w 37°C z wytrząsaniem 1000 rpm, by umożliwić w tym czasie aktywację szlaków biochemicznych prowadzących m.in. do lokalnej syntezy białka. Po tym czasie próbki przenoszono na lód. Równocześnie próbka niestymulowana była inkubowana na lodzie w celu analizy podstawowego poziomu białek neurologin w obu genotypach.

By potwierdzić aktywację receptorów NMDA w następstwie powyższej stymulacji synaptoneurosomów przeprowadzono analizę poziomu fosforylacji białek ERK1 i ERK2 (kinaz regulowanych przez sygnały zewnątrzkomórkowe) w tych samych próbkach za pomocą metody Western blot. Białka ERK1 i ERK2 należą do rodziny kinaz aktywowanych mitogenami o aktywności serynowo-treoninowej, które propagują sygnał zewnętrzny poprzez kaskadę fosforylacji w celu generowania skoordynowanej odpowiedzi komórki na bodziec ze środowiska. Kinaza ERK1/2 jest odpowiedzialna za fosforylację czynników transkrypcyjnych c-fos, c-myc, Elk-1 oraz kinaz białkowych MNK (MAPK signal interacting kinase), MSK (mitogen and stress-activated protein kinase) i RSK (ribosomal S6 kinase), co oznacza aktywację ścieżek sygnałowych prowadzących do syntezy białek (Raman, Chen, and Cobb 2007).

Jak zaprezentowano na rycinie 30, w synaptoneurosomach obu genotypów poziom fosforylowanych białek ERK1 (około 44 kDa) i ERK2 (około 42 kDa) przejściowo wzrósł w czasie 2,5 minut po stymulacji (2,5') w porównaniu do poziomu podstawowego tych białek (P). Na rycinie 30 przedstawiono też zależny od aktywności synaptycznej całkowity poziom białek ERK1 i ERK2 oraz kontrolę ilości białka w postaci GAPDH, będącego enzymem glikolizy.



Rycina 30. Analiza poziomu zależnej od aktywności synaptycznej fosforylacji białek ERK1 (44 kDa) i ERK2 (42 kDa) w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. P – stan podstawowy; 2,5', 5', 10', 20' – czas po stymulacji receptorów NMDA w minutach. Analizowano też całkowity poziom białek ERK1 i ERK2 oraz kontrolnego białka GAPDH, enzymu glikolizy (38 kDa).

Aby utrwalić białka, które w warunkach fizjologicznych występują w błonie w bardzo niewielkiej odległości i tworzą dimery stymulowane synaptoneurosomy poddano chemicznemu sieciowaniu *in situ* białek powierzchniowych za pomocą odczynnika BS³. Proces został zatrzymany poprzez dodanie glicyny, a ekstrakty białkowe uzyskano za pomocą lizy komórek. To podejście zostało opracowane przez inną grupę badawczą (Poulopoulos et al. 2012) w celu zbadania homodimerów i heterodimerów tworzonych przez poszczególne izoformy neuroligin w pierwotnych hodowlach neuronów. Przygotowane próbki poddano elektroforezie białek SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym. Następnie przeprowadzono analizę Western blot w celu detekcji białek reprezentujących zewnątrzkomórkowe (dimery) lub wewnątrzkomórkowe (monomery) formy neuroligin. Analiza różnicowa i porównanie ilości poszczególnych form neuroligin było możliwe dzięki różnej masie molekularnej dimerów (około 300 kDa) i monomerów (około 120 kDa).

W wyniku tego eksperymentu udało się uwidocznic na jednym blacie dwie formy neuroligin, o różnej lokalizacji komórkowej w tak niewielkiej części komórki jaką jest synapsa. Podstawowy poziom (P) zewnątrzkomórkowych (zakotwiczone w błonie białka powierzchniowe) i wewnątrzkomórkowych neuroligin analizowano w niestymulowanych synaptoneurosomach oraz w neuronach z pierwotnych hodowli hipokampalnych. Co więcej, obserwowano też zmiany w dystrybucji i ekspresji zewnątrzkomórkowych dimerów neuroligin i wewnątrzkomórkowych monomerów neuroligin po pobudzeniu neuronalnym prowadzącym do lokalnej syntezy białka.

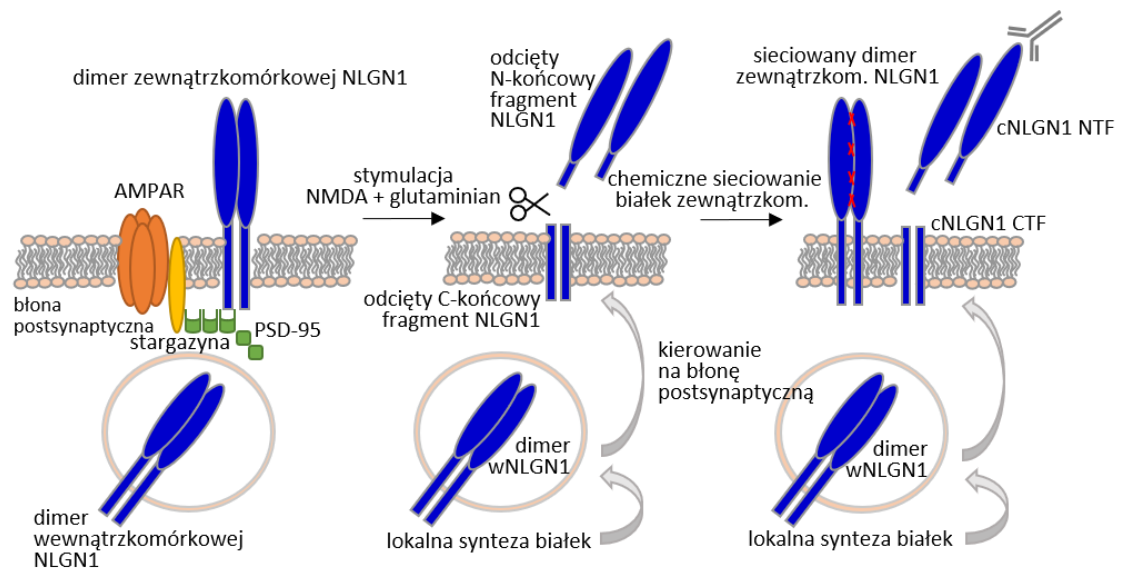
Używając tej metody uwidoczniło się dynamikę zmian lokalizacji neurologin wywołaną przez aktywację receptorów NMDA.

Przeprowadzone eksperymenty miały na celu poznanie zależnej od aktywności synaptycznej lokalizacji neurologin w warunkach fizjologicznych (myszy o genotypie dzikim) oraz w zespole łamliwego chromosomu X (myszy *Fmr1* KO) oraz porównanie przebiegu tego procesu pomiędzy analizowanymi genotypami. Powyżej opisaną charakterystykę przeprowadzono osobno dla każdej izofory neurologin: NLGN1, NLGN2 oraz NLGN3.

4.4.1. Neurologina 1

4.4.1.1. Sieciowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

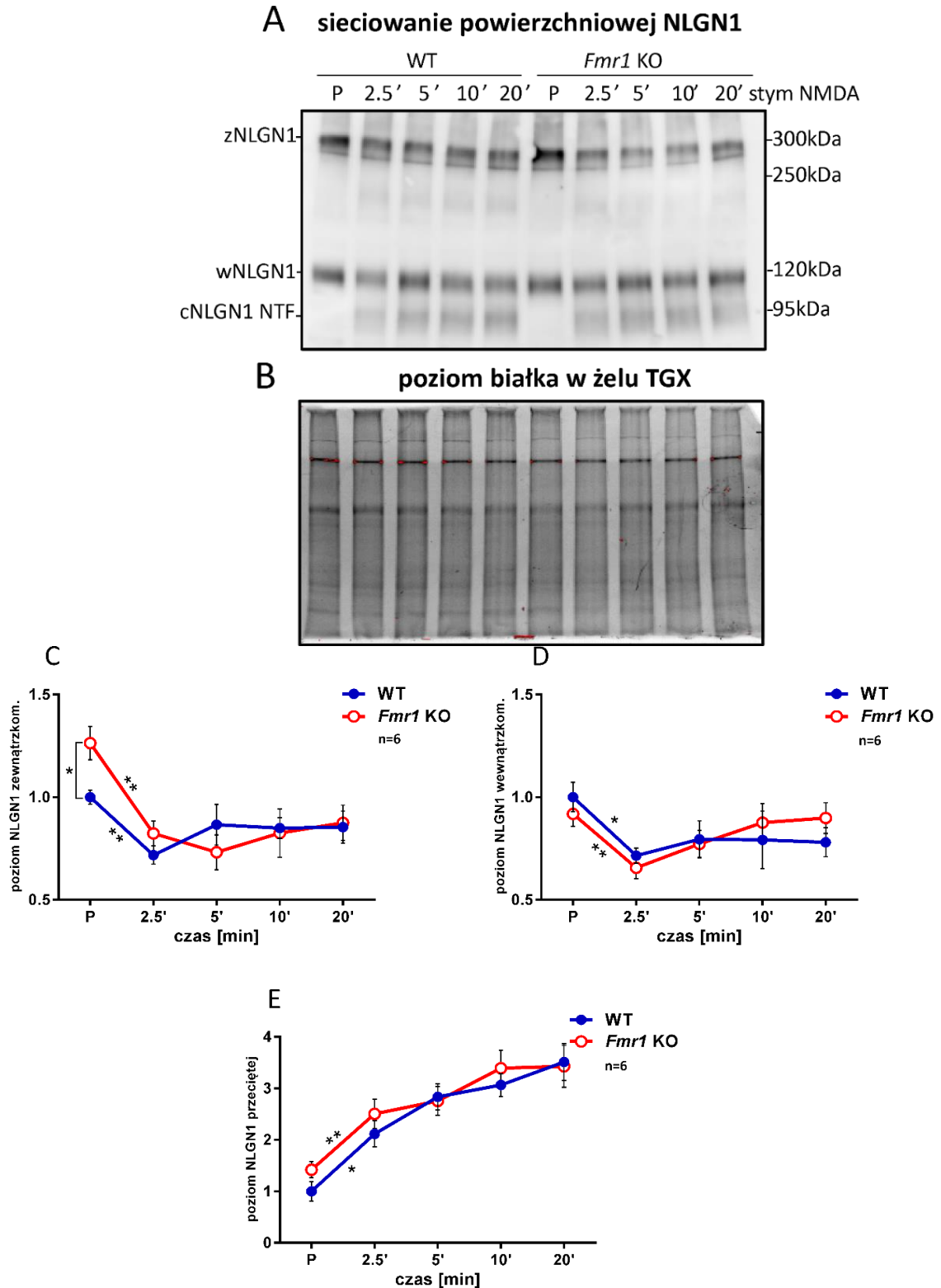
Na schemacie prezentującym lokalną syntezę, kierowanie na błonę postsynaptyczną i cięcie proteolityczne białka NLGN1 w odpowiedzi na pobudzenie neuronalne przedstawiono formy NLGN1 wizualizowane metodą Western blot po stymulacji i sieciowaniu białek w synaptoneurosomach: zewnątrzkomórkową NLGN1, wewnątrzkomórkową NLGN1 i odcięty N-końcowy fragment NLGN1 (Rycina 31).



Rycina 31. Schemat prezentujący lokalną syntezę, kierowanie na błonę postsynaptyczną i cięcie proteolityczne białka NLGN1 w odpowiedzi na aktywację synaptyczną. Przedstawiono formy NLGN1 wykrywane metodą Western blot po sieciowaniu białek na powierzchni synaptoneurosomów: zewnątrzkomórkową, wewnątrzkomórkową i odcięty N-końcowy fragment białka NLGN1.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu na jednym blacie zobrazowano poziom NLGN1 w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5, 5, 10, 20 minut po stymulacji

receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy WT oraz *Fmr1* KO (Rycina 32A). Z przeprowadzonej analizy wynika, że sieciowane zewnątrzkomórkowe dimery zawierające NLGN1 (zNLGN1) mają masę molekularną około 300 kDa, a wewnątrzkomórkowe monomery NLGN1 (wNLGN1) mają masę molekularną około 120 kDa. Dolny panel przedstawia obraz żelu TGX, którego użyto do detekcji białka NLGN1 metodą Western blot, co stanowiło kontrolę równej ilości nałożonego białka (Rycina 32B).



Rycina 32. (A) Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN1 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot z przeciwciałem rozpoznającym zewnątrzkomórkową domenę białka NLGN1. Sieciowane zewnątrzkomórkowe dimery NLGN1 (zNLGN1) obecne w błonie postsynaptycznej mają masę około 300kDa (homo- i heterodimery zawierające NLGN1), wewnątrzkomórkowe monomery NLGN1

(wNLGN1) mają masę 120kDa, a odcięte N-końcowe fragmenty NLGN1 (cNLGN1 NTF) mają masę około 95kDa. **(B)** Kontrola poziomu białka w żelu TGX, którego użyto do detekcji białka NLGN1. **(C)** Zależny od aktywacji synaptycznej poziom zewnątrzkomórkowej NLGN1 (zNLGN1), **(D)** wewnątrzkomórkowej NLGN1 (wNLGN1) i **(E)** odciętego N-końcowego fragmentu białka NLGN1 (cNLGN1 CTF) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po sieciowaniu białek powierzchniowych i analizie Western blot. Obliczenia densytometryczne wykonano na podstawie pomiaru intensywności prążków. Wykresy przedstawiają średnie wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu podstawowego WT P, n=6 eksperymentów, 2 myszy na genotyp na eksperyment, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta dla porównań pomiędzy genotypami i sparowanego testu t-Studenta dla porównań w obrębie genotypu.

Przedstawione na Rycinie 32C-E, obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków z sześciu niezależnych eksperymentów wykazały podwyższony podstawowy poziom zewnątrzkomórkowych dimerów zawierających NLGN1 w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO w porównaniu do myszy WT (26% wzrost poziomu zNLGN1, $p=0,0136$, $t=2,988$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 32C).

Poziom wewnątrzkomórkowych monomerów NLGN1 (wNLGN1) nie różnił się między genotypami w stanie podstawowym ($p=0,5824$, $t=0,5651$, $df=12$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 32D).

Co ciekawe, po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach zarówno myszy o genotypie dzikim, jak i *Fmr1* KO zaobserwowano pojawienie się dodatkowego prążka (odpowiadającego masie molekularnej około 95 kDa, rycina 32A). Przeciwciała użyte do immunodetekcji w tym eksperymencie rozpoznaje zewnątrzkomórkową domenę NLGN1, co wskazywało, że te prążki odpowiadają odciętemu N-końcowemu fragmentowi NLGN1 (cNLGN1 NTF około 95 kDa), jak opisano we wcześniejszych publikacjach (Peixoto et al. 2012; Suzuki et al. 2012). Uchwyconemu procesowi proteolizy towarzyszył znaczny spadek poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN1, który wykrywalny był już w ciągu 2,5 minut po stymulacji receptorów NMDA, co istotne dla obu genotypów myszy WT i *Fmr1* KO (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ według sparowanego testu t Studenta; rycina 32C, E). Powyższa obserwacja potwierdza indukowane za pomocą aktywności synaptycznej cięcie proteolityczne zewnątrzkomórkowych dimerów NLGN1.

Jednocześnie poziom wewnątrzkomórkowej NLGN1 również ulegał zmniejszeniu po stymulacji receptorów NMDA przez 2,5 minuty w przypadku obu genotypów myszy. Ta zależność występowała prawdopodobnie ze względu na indukcję procesu kierowania

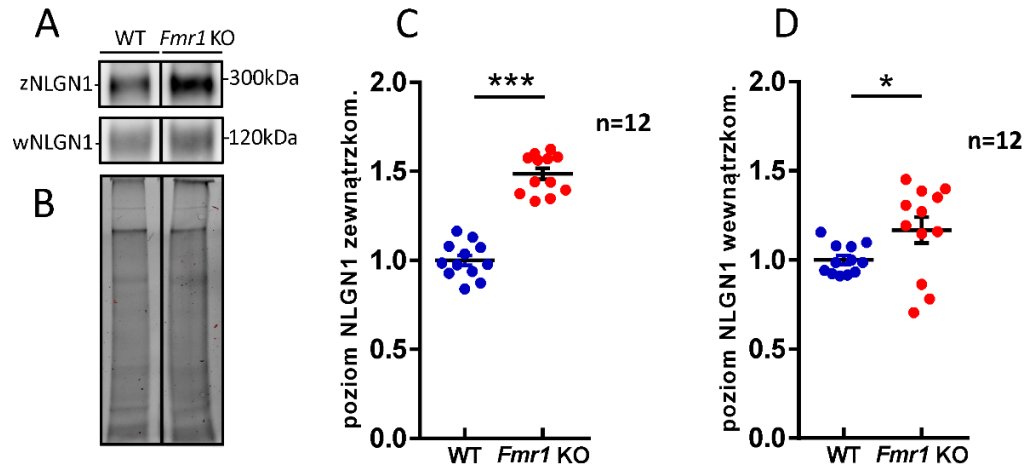
wewnątrzkomórkowych form NLGN1 na powierzchnię synapsy oraz jej inkorporację do gęstości błony postsynaptycznej (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ według sparowanego testu t Studenta; rycina 32D). Co ważne, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w intensywności cięcia proteolitycznego NLGN1 pomiędzy synaptoneurosomami myszy WT i *Fmr1* KO (Rycina 32E).

Uwidocznione zmiany w proporcjach zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN1 reprezentują dynamikę kierowania białek NLGN1 z wnętrza synapsy (systemu transportu pęcherzykowego) do błony postsynaptycznej. Jak wykazały przeprowadzone doświadczenia zmiany wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego poziomu NLGN1 są zależne od dwóch czynników: aktywności synaptycznej oraz cięcia proteolitycznego.

4.4.1.2. Sieciowanie białek powierzchniowych na komórkach nerwowych w pierwotnych hodowlach hipokampalnych

Aby potwierdzić powyższą obserwację w innym modelu badawczym niż synaptoneurosomy przeprowadzono sieciowanie białek powierzchniowych na komórkach nerwowych w pierwotnych hodowlach hipokampalnych założonych z osesków myszy WT i *Fmr1* KO. Hodowle neuronalne prowadzone były przez 19 dni *in vitro*, a następnie poddane chemicznemu sieciowaniu białek powierzchniowych z użyciem odczynnika BS³. Proces został zatrzymany poprzez dodanie glicyny, a ekstrakty białkowe uzyskano poprzez lizę komórek. Po zmierzeniu ilości białka przy użyciu testu BCA białka poddano elektroforezie SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym, przeniesieniu na membranę PVDF i detekcji poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN1 i wewnątrzkomórkowej NLGN1 za pomocą metody Western blot (Rycina 33A, B).

sieciowanie powierzchniowej NLGN1 w hodowlach neuronów hipokampalnych



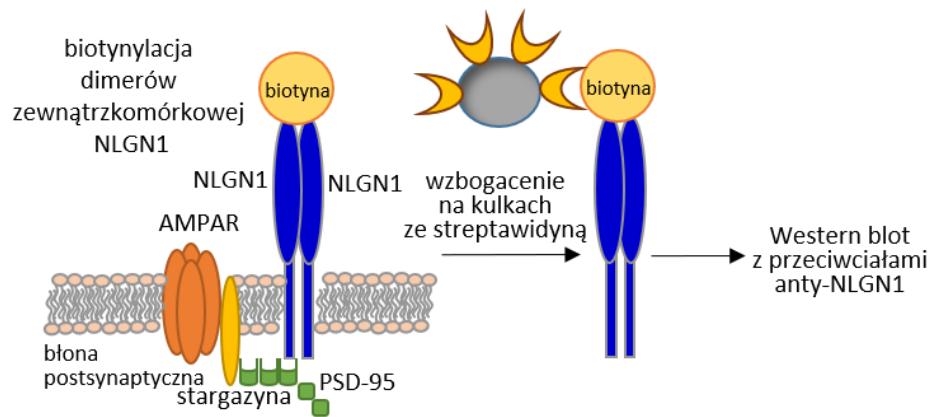
Rycina 33. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu (C) zewnątrzkomórkowych sieciowanych dimerów NLGN1 (zNLGN1) i (D) wewnątrzkomórkowych monomerów NLGN1 (wNLGN1) w 19 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych z myszy WT i *Fmr1* KO, n=12 dołków z 4 różnych hodowli neuronalnych. Wykresy przedstawiają wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu WT; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta.

W wyniku tego eksperymentu również zaobserwowano podwyższony poziom powierzchniowych białek NLGN1 (zNLGN1) w hodowlach komórek nerwowych uzyskanych z myszy *Fmr1* KO w porównaniu z genotypem dzikim WT (49% wzrost poziomu zNLGN1, $p < 0,0001$, $t=11,45$, $df=22$ według niesparowanego testu t Studenta, n=12; rycina 33C). W tym przypadku wykryto też zwiększony poziom wewnątrzkomórkowej NLGN1 (wNLGN1) w hodowlach neuronów z myszy *Fmr1* KO (16% wzrost poziomu wNLGN1, $p=0,0398$, $t=2,185$, $df=22$ według niesparowanego testu t Studenta, n=12; rycina 33D).

4.4.1.3. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

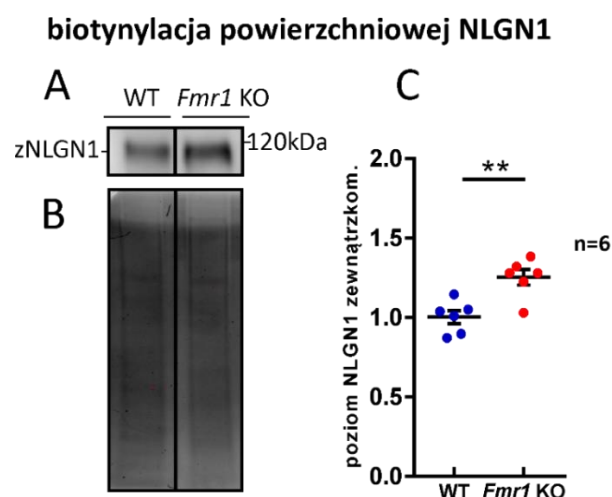
Aby potwierdzić uzyskane wyniki wskazujące na zwiększony poziom NLGN1 na powierzchni błony synaptycznej użyto dodatkowo metody biotynylacji białek powierzchniowych za pomocą innego przeciwciała rozpoznającego domenę cytoplazmatyczną NLGN1. W tym celu wykorzystano znane powinowactwo biotyny do streptawidyny (Dundas, Demonte, and Park 2013). W skrócie, świeżo wyizolowane synaptoneurosomy myszy WT i *Fmr1* KO inkubowano z biotyną przez 30 minut w 4°C , a następnie przez 2 godziny w 4°C wiązano wyznakowane biotyną białka

powierzchniowe do kulek magnetycznych pokrytych streptawidyną. W końcowym etapie eksperymentu przeprowadzono analizę Western blot w celu detekcji poziomu powierzchniowej NLGN1 (Rycina 34).



Rycina 34. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN1 metodą Western blot.

Jak przedstawiono na rycinie 35, analiza Western blot oraz wyniki obliczeń densytometrycznych wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków z sześciu niezależnych eksperymentów potwierdziły zwiększony poziom powierzchniowych dimerów NLGN1 w stanie podstawowym w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO w porównaniu do myszy WT (wzrost o 25%, $p=0,0331$, $t=3,88$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 35).



Rycina 35. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i (C) obliczenia densytometryczne na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN1 (zNLGN1) w synaptoneurosomach myszy WT i

Fmr1 KO po biotynylacji białek powierzchniowych. Wykres przedstawia otrzymane wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu WT, ** $p < 0,01$, $n=6$ eksperymentów, obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta.

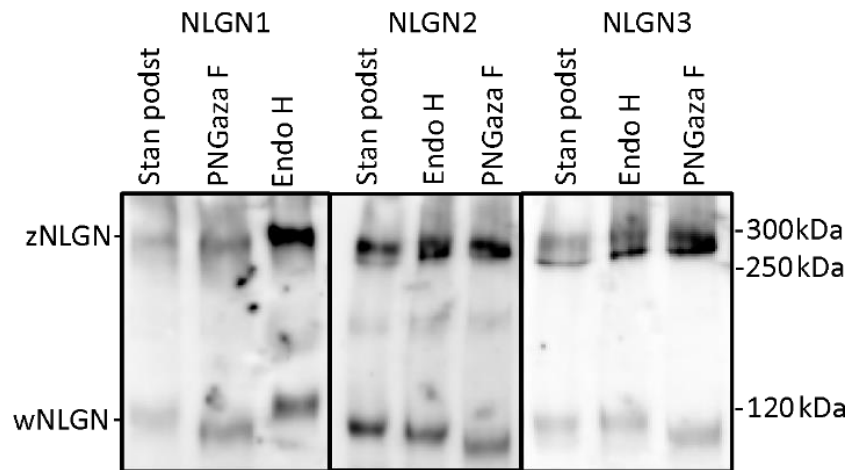
Podsumowując powyższe wyniki dla NLGN1, w przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że podstawowy poziom zewnątrzkomórkowej NLGN1 jest podwyższony na synapsie myszy *Fmr1* KO w porównaniu do myszy WT. Tę zależność potwierdzono używając dwóch niezależnych metod – sieciowania i biotynylacji białek powierzchniowych w dwóch modelach badawczych – synaptoneurosomach i pierwotnych hodowlach komórek hipokampalnych. Ponadto, analizując zależną od aktywności synaptycznej dystrybucję NLGN1 wykryto, że poziom zewnątrzkomórkowej NLGN1 znacznie zmniejsza się już w ciągu 2,5 minut po stymulacji receptorów NMDA. Ta obserwacja wynika z cięcia proteolitycznego NLGN1, które skutkuje pojawieniem się prążka reprezentującego N-końcowy fragment odciętej NLGN1 o masie molekularnej około 95 kDa. Co istotne, analiza densytometryczna wykonana na podstawie pomiaru intensywności prążków nie wykazała różnicy w intensywności cięcia proteolitycznego NLGN1 u myszy WT i *Fmr1* KO. Ponadto, okazało się, że poziom wewnątrzkomórkowej NLGN1 zmniejsza się w 2,5 minuty po pobudzeniu neuronalnym, a następnie zwiększa się prawdopodobnie w wyniku lokalnej syntezy białka NLGN1 w synapsie.

4.4.1.4. Deglikozylacja białek neuroigin w synaptoneurosomach

Uwidocznione na żelu prążki odpowiadające sieciowanym dimerom neuroigin lokalizowały się na wyższej masie molekularnej niż oczekiwana (około 300 kDa zamiast około 240 kDa). Prawdopodobną przyczyną takiego wyniku jest fakt, iż neuroiginy podlegają procesowi glikozylacji, która znacznie zwiększa masę molekularną białka. Hipoteza ta została zweryfikowana przy użyciu enzymów usuwających N-związane reszty sacharydowe (Rycina 36). Przeprowadzona analiza Western blot wykazała, że inkubacja z enzymem endoglikozydazy H (Endo H) usuwającym reszty wysokomannozowe i hybrydowe N-glikany wewnątrz białka nie wpłynęła na obniżenie masy cząsteczkowej NLGNs, co sugeruje, że te białka nie podlegają glikozylacji tych reszt sacharydowych (Trimble and Tarentino 1991). Z kolei traktowanie enzymem N-glikozydazy F (PNGaza F) zmniejszyło masę molekularną monomerów NLGN1, NLGN2 i NLGN3, nie wpływając jednak na masę molekularną dimerów NLGNs, co świadczy o tym, że białka NLGNs ulegają procesowi N-glikozylacji przy samej

asparaginie zlokalizowanej blisko C-końca białka (Plummer, Phelan, and Tarentino 1987).

sieciowanie powierzchniowych NLGN

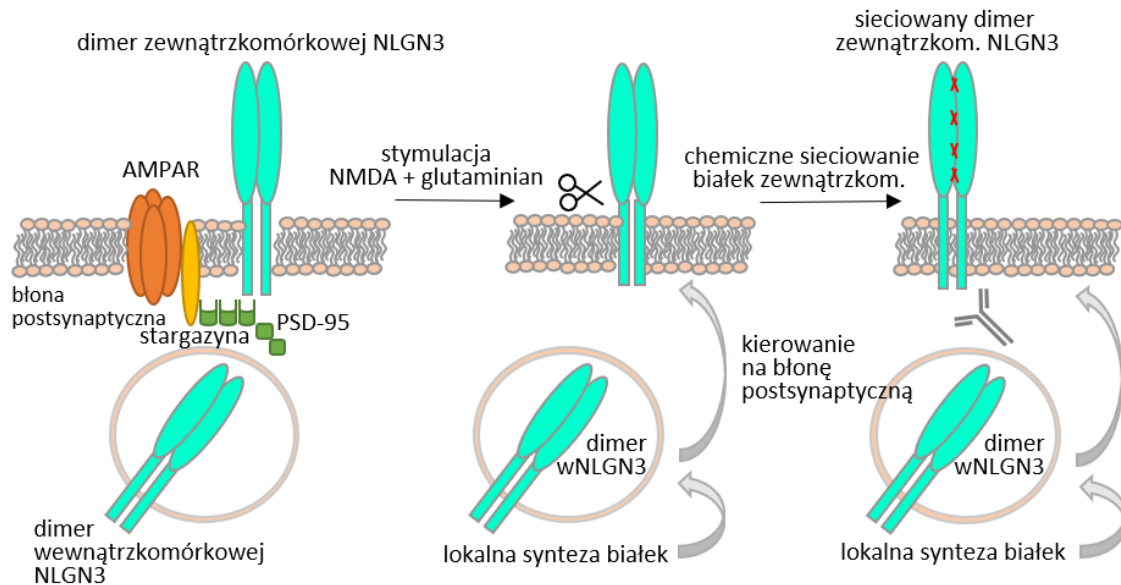


Rycina 36. Analiza masy molekularnej zewnątrzkomórkowych NLGN1, NLGN2, NLGN3 (zNLGN) i wewnątrzkomórkowych NLGN1, NLGN2, NLGN3 (wNLGN) metodą Western blot po deglikozylacji sieciowanych białek z użyciem enzymów N-glikozydazy F (PNGazy F) i endoglikozydazy H (Endo H).

4.4.2. Neuroligina 3

4.4.2.1. Sיעiowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

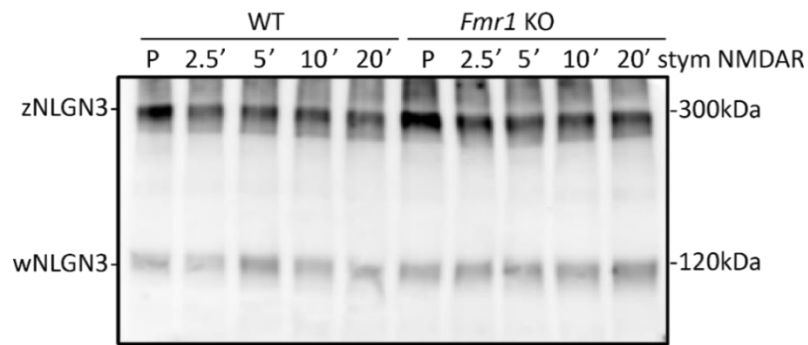
Zależną od aktywności synaptycznej dynamikę rozmieszczenia NLGN3 w synapsie myszy WT i *Fmr1* KO zbadano przy użyciu takich samych metod jak dla NLGN1. Przeprowadzono stymulację receptorów NMDA i sieciovanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach, a następnie analizę Western blot (Rycina 37).



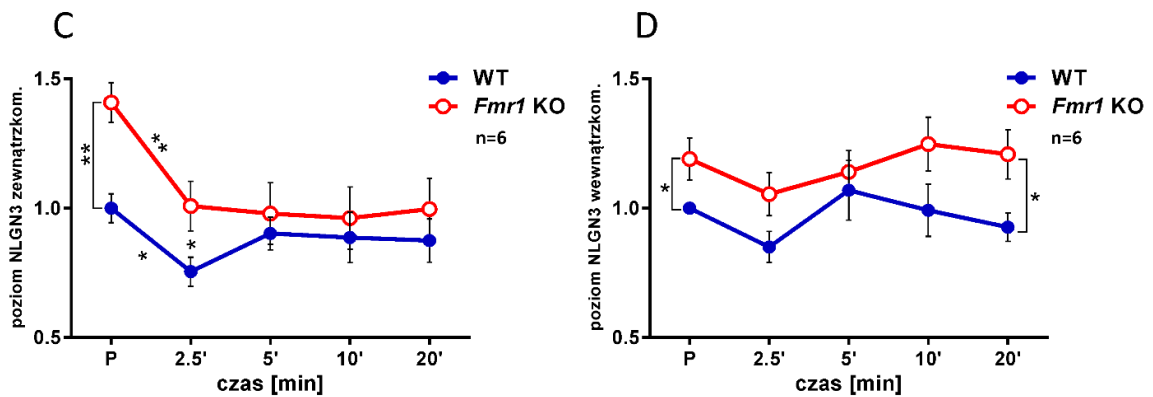
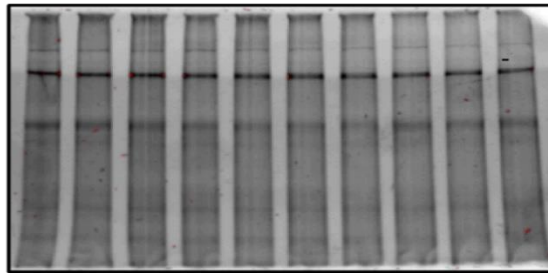
Rycina 37. Schemat prezentujący lokalną syntezę, kierowanie na błonę postsynaptyczną i przypuszczalne cięcie proteolityczne białka NLGN3 w odpowiedzi na aktywność synaptyczną. Wskazano fragmenty NLGN3 wykrywane metodą Western blot po stymulacji i sieciovaniu białek na synaptoneurosomach: zewnętrzkomórkową i wewnątrzkomórkową.

Tym razem ze względu na brak dostępnego przeciwciała wykrywającego domenę zewnętrzkomórkową NLGN3 użyto przeciwciała rozpoznającego domenę cytoplazmatyczną NLGN3. Rycina 38 przedstawia poziom NLGN3 w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5, 5, 10, 20 minut po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy WT oraz *Fmr1* KO (rycina 38A) oraz kontrolę poziomu białka w żelu TGX (rycina 38B).

A sieciowanie powierzchniowej NLGN3



B poziom białka w żelu TGX



7Rycina 38. (A) Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot z przeciwciałem rozpoznającym wewnątrzkomórkową domenę białka NLGN3. Sieciowane zewnątrzkomórkowe dimery NLGN3 (zNLGN3) obecne w błonie postsynaptycznej mają masę około 300kDa (homo- i heterodimery zawierające NLGN3), a wewnątrzkomórkowe monomery NLGN3 (wNLGN3) mają masę 120kDa. (B) Kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX, którego użyto do detekcji białka NLGN3. (C) Zależny od aktywacji synaptycznej poziom zewnątrzkomórkowej NLGN3 (zNLGN3) i (D) wewnątrzkomórkowej NLGN3 (wNLGN3) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po sieciowaniu białek powierzchniowych i analizie Western blot. Obliczenia densytometryczne wykonano na podstawie pomiaru intensywności prążków. Wykresy przedstawiają średnie wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu podstawowego WT P, n=6 eksperymentów, 2 myszy na genotyp na eksperyment, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta dla porównań pomiędzy genotypami i sparowanego testu t-Studenta dla porównań w obrębie genotypu.

Na podstawie analizy densytometrycznej intensywności otrzymanych prążków wykryto, że podstawowy poziom zewnątrzkomórkowych dimerów zawierających NLGN3 (zNLGN3 około 300 kDa) jest znacznie podwyższony w synaptoneurosomach izolowanych z myszy *Fmr1* KO w porównaniu do WT (wzrost o 41%, $p=0,0016$, $t=24,274$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 38C).

Poziom wewnątrzkomórkowej NLGN3 (wNLGN3 około 120 kDa) również był zwiększony w stanie podstawowym w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO (wzrost o 19%, $p=0,00457$, $t=2,2281$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 38D).

Analizując zależne od aktywności synaptycznej zmiany w dystrybucji NLGN3, podobnie jak w przypadku NLGN1, zaobserwowano spadek poziomu powierzchniowych dimerów NLGN3, który następował w ciągu 2,5 minut po pobudzeniu neuronalnym (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ według sparowanego testu t Studenta; rycina 38C). Powyższa zależność ponownie wystąpiła dla obu analizowanych genotypów WT i *Fmr1* KO. Ten wynik wskazuje, że NLGN3 jest również cięta pod wpływem stymulacji, tym bardziej, że NLGN3 może występować na błonie postsynaptycznej w postaci dimeru z NLGN1.

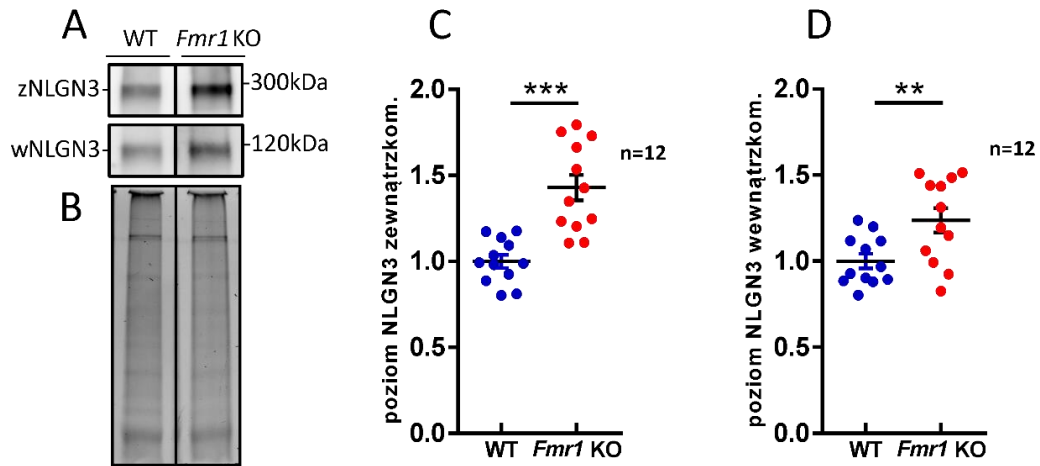
Poziom wewnątrzkomórkowej formy NLGN3 również wykazywał tendencję spadkową po stymulacji receptorów NMDA (rycina 38D). Co ciekawe, w przypadku synaptoneurosomów izolowanych z myszy *Fmr1* KO zaobserwowano znacznie szybsze odzyskiwanie wewnątrzkomórkowej puli NLGN3 do poziomu podstawowego, co może wynikać z ich zwiększonej translacji synaptycznej (* $p < 0,05$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 38D).

4.4.2.2. Sieciowanie białek powierzchniowych w pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych

Uzyskane wyniki, wskazujące na podwyższony poziom NLGN3 w rejonie zewnątrzkomórkowym oraz wewnątrzkomórkowym w synapsie myszy *Fmr1* KO zostały dodatkowo potwierdzone w pierwotnych hodowlach neuronów hipokampalnych. W tym modelu badawczym również zaobserwowano większą ilość zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych białek NLGN3 w stanie podstawowym w przypadku myszy *Fmr1* KO w porównaniu do WT (43% wzrost poziomu zNLGN3, $p < 0,0001$, $t=5,154$,

df=22 i 24% wzrost poziomu wNLGN3, $p=0,0085$, $t=2,888$, $df=22$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=12$; rycina 39).

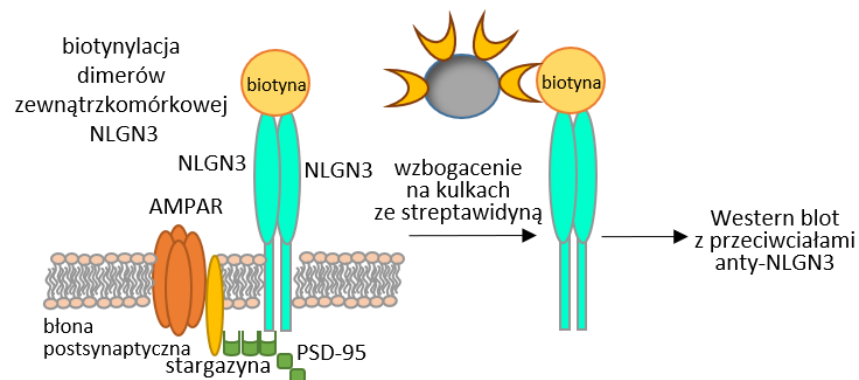
siecianowanie powierzchniowej NLGN3 w hodowlach neuronów hipokampalnych



Rycina 39. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu (C) zewnątrzkomórkowych sieciowanych dimerów NLGN3 (zNLGN3) i (D) wewnątrzkomórkowych monomerów NLGN3 (wNLGN3) w 19 dniu *in vitro* pierwotnej hodowli neuronów hipokampalnych z myszy WT i *Fmr1* KO, $n=12$ dołków z 4 różnych hodowli neuronalnych. Wykresy przedstawiają uzyskane wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu WT; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta.

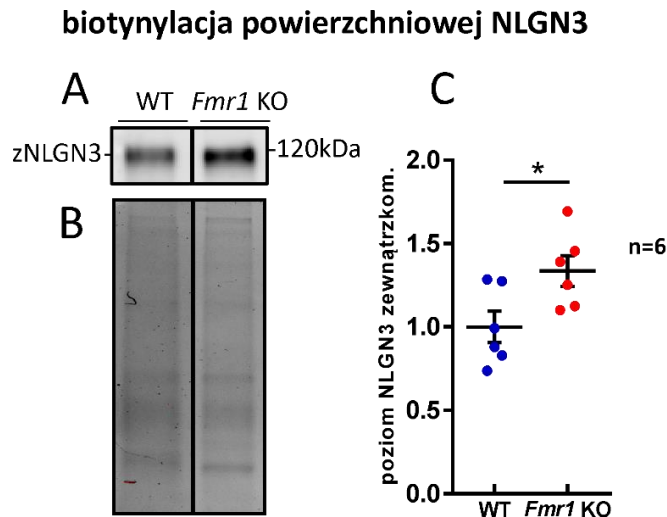
4.4.2.3. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

Poziom zewnątrzkomórkowych białek NLGN3 pomiędzy genotypami porównano też za pomocą metody biotynylacji białek powierzchniowych oraz detekcji metodą Western blot. Schemat eksperymentu przedstawiono na rycinie 40.



Rycina 40. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN3 metodą Western blot.

Analiza porównawcza ilości biotynylowanej powierzchniowej NLGN3 w stanie podstawowym potwierdziła, że poziom NLGN3 na błonie postsynaptycznej jest znacząco podwyższony w synaptoneurosomach myszy *Fmr1* KO w porównaniu do WT (34% wzrost z NLGN3, $p=0,0287$, $t=2,55$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 41).



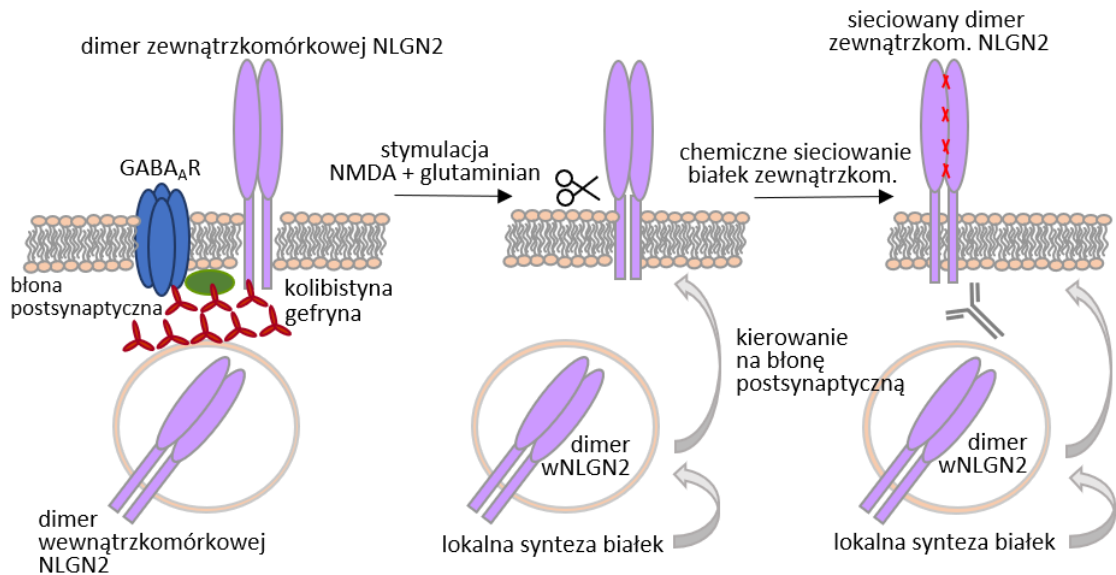
Rycina 41. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i (C) obliczenia densytometryczne na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN3 (zNLGN3) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po biotynylacji białek powierzchniowych. Wykres przedstawia uzyskane wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu WT, * $p < 0,05$, $n=6$ eksperymentów, obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta.

Podsumowując, zgromadzone dane dla NLGN3 wskazują, że poziom zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej formy NLGN3 jest znacznie podwyższony w stanie podstawowym na synapsie myszy *Fmr1* KO, co udowodniono metodami sieciowania oraz biotynylacji białek powierzchniowych. W przypadku obu genotypów zaobserwowano znaczny spadek zewnątrzkomórkowej NLGN3 po pobudzeniu neuronalnym, co wskazuje, że NLGN3, podobnie jak NLGN1 ulega cięciu proteolitycznemu. Ponadto, u myszy *Fmr1* KO zauważono szybsze przywracanie poziomu wewnątrzkomórkowej formy NLGN3, prawdopodobnie ze względu na podwyższony proces translacji tego białka w synapsach myszy *Fmr1* KO.

4.4.3. Neuroligina 2

4.4.3.1. Sieciowanie białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

Doświadczenia dla NLGN2 przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku analizy białek NLGN1 i NLGN3 (Rycina 42).



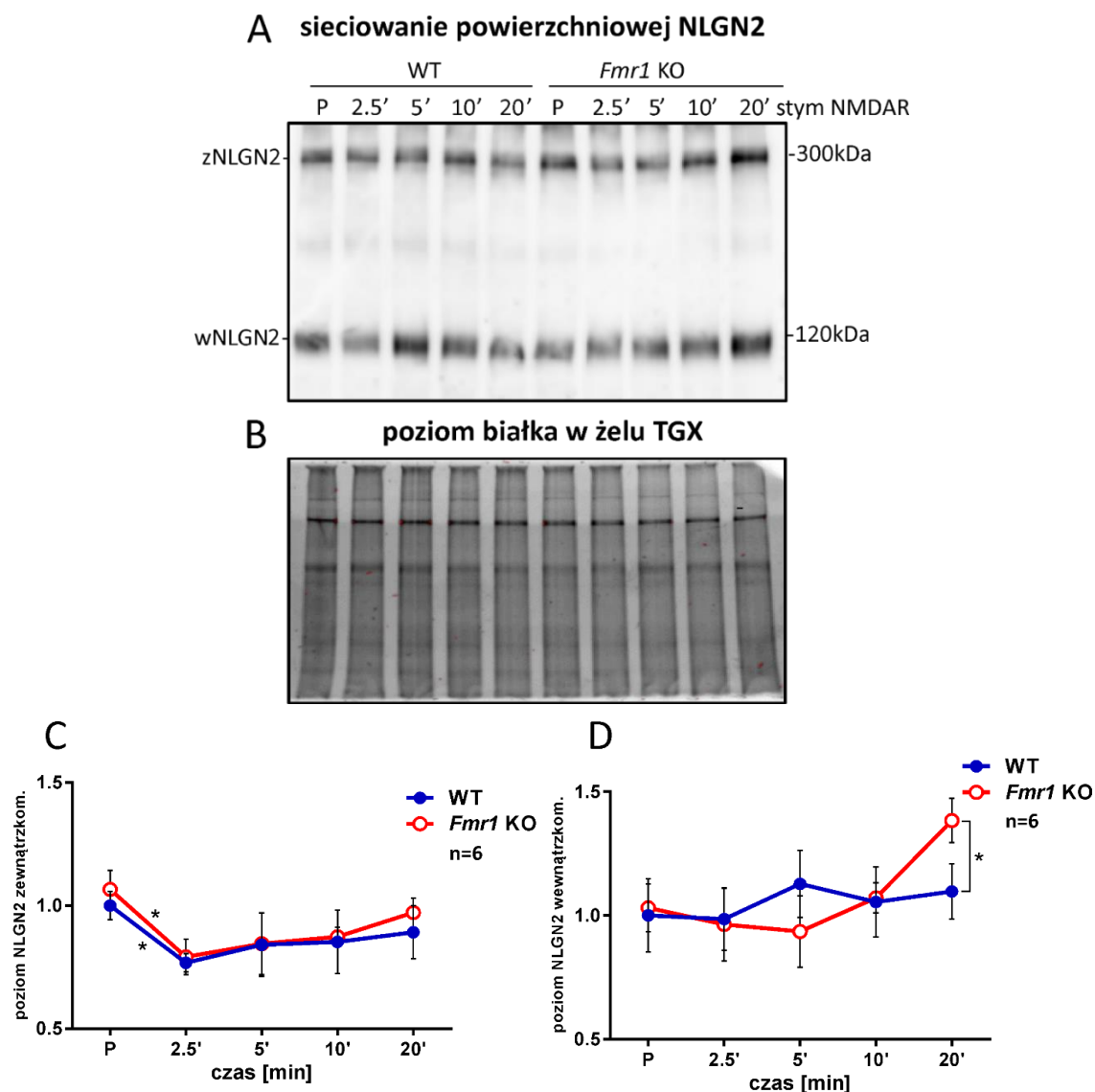
Rycina 42. Schemat sieciowania dimerów NLGN2 oraz stymulacji receptorów NMDA prowadzącej do lokalnej syntezy białka NLGN2 i kierowania NLGN2 na błonę postsynaptyczną. Wskazano fragmenty NLGN2 wykrywane przeciwciałem.

Sieciowanie białek powierzchniowych na synaptoneurosomach *in situ*, a następnie analiza Western blot z przeciwciałem rozpoznającym domenę cytoplazmatyczną NLGN2 nie ujawniła różnicy w podstawowym poziomie zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN2 pomiędzy synaptoneurosomami myszy WT i *Fmr1* KO (rycina 43).

Analiza dynamiki zmian lokalizacji NLGN2 po indukcji synaptycznej wykazała, że w ciągu 2,5 minuty po stymulacji receptorów NMDA następuje znaczny spadek poziomu powierzchniowych dimerów zawierających NLGN2 (zNLGN2) (* $p < 0,05$ według sparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 43C). Powyższą zależność ponownie zaobserwowano w synaptoneurosomach obu genotypów myszy WT i *Fmr1* KO, podobnie jak w przypadku białek NLGN1 i NLGN3. Otrzymany wynik sugeruje, że NLGN2 również może podlegać cięciu proteolitycznemu na synapsie, co nie zostało jeszcze udokumentowane przez żadną inną grupę badawczą.

Poziom wewnątrzkomórkowych białek NLGN2 nie zmieniał się znacząco w ciągu 2,5 minuty w odpowiedzi na stymulację synaptoneurosomów obu genotypów myszy WT

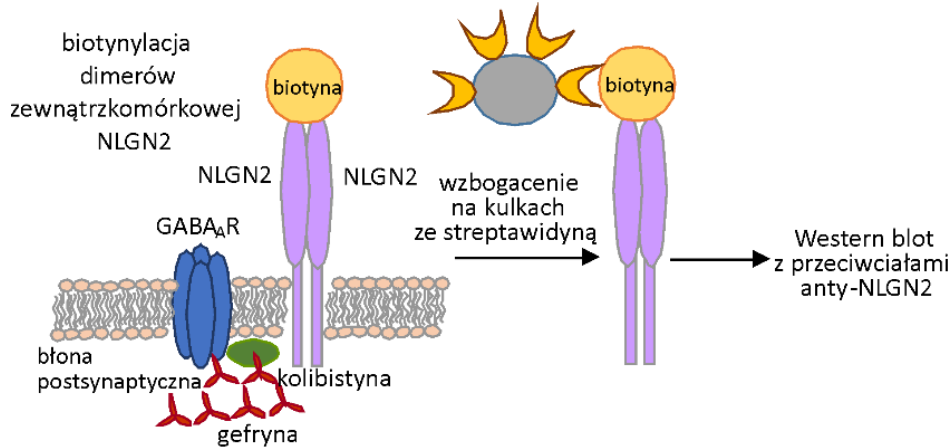
i *Fmr1* KO ($p > 0,05$, według sparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 43D). Jednakże, w przypadku synaptoneurosomów myszy *Fmr1* KO zaobserwowano znaczny wzrost wewnątrzkomórkowej NLGN2 (wNLGN2) w porównaniu do myszy WT w 20 minut po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach (* $p < 0,05$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 43D).



Rycina 43. (A) Porównanie zależnego od aktywności synaptycznej poziomu zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN2 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO za pomocą analizy Western blot z przeciwciałem rozpoznającym wewnątrzkomórkową domenę białka NLGN2. Sieciowane zewnątrzkomórkowe dimery NLGN2 (zNLGN2) obecne w błonie postsynaptycznej mają masę około 300kDa (homo- i heterodimery zawierające NLGN2), a wewnątrzkomórkowe monomery NLGN2 (wNLGN2) mają masę 120kDa. (B) Kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX, którego użyto do detekcji białka NLGN2. (C) Zależny od aktywacji synaptycznej poziom zewnątrzkomórkowej NLGN2 (zNLGN2) i (D) wewnątrzkomórkowej NLGN2 (wNLGN2) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po sieciowaniu białek powierzchniowych i analizie Western blot. Obliczenia densytometryczne wykonano na podstawie pomiaru intensywności prążków. Wykresy przedstawiają średnie wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu podstawowego WT P, n=6 eksperymentów, 2 myszy na genotyp na eksperyment, * $p < 0,05$ obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta dla porównań pomiędzy genotypami i sparowanego testu t-Studenta dla porównań w obrębie genotypu.

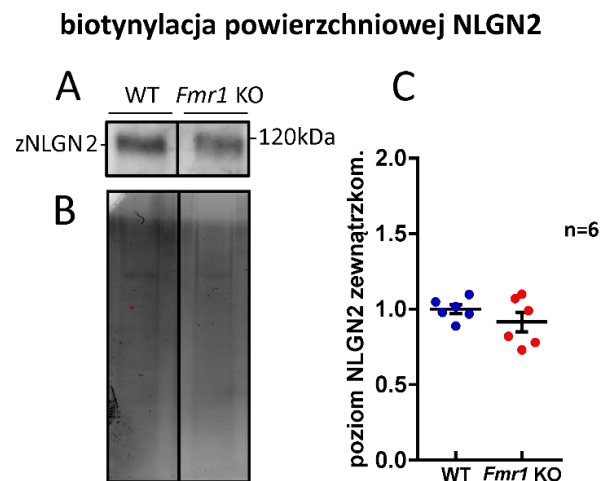
4.4.3.2. Biotynylacja białek powierzchniowych w synaptoneurosomach

Powyższy wynik został następnie potwierdzony za pomocą metody biotynylacji białek zewnątrzkomórkowych. Schemat eksperymentu przedstawiono na rycinie 44.



Rycina 44. Schemat eksperymentu biotynylacji białek powierzchniowych w synaptoneurosomach oraz detekcji poziomu zewnątrzkomórkowych NLGN2 metodą Western blot.

Obliczenia densytometryczne wykonane na podstawie pomiaru intensywności prążków zNLGN2 z sześciu niezależnych eksperymentów wskazały na ten sam poziom zewnątrzkomórkowych białek NLGN2 w synaptoneurosomach izolowanych z myszy WT i *Fmr1* KO w stanie podstawowym ($p=0,2593$, $t=1,2$, $df=10$ według niesparowanego testu t Studenta, $n=6$; rycina 45).



Rycina 45. (A) Analiza Western blot, (B) kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX i (C) obliczenia densytometryczne na podstawie pomiaru intensywności prążków poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN2 (zNLGN2) w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO po biotynylacji białek powierzchniowych. Wykres przedstawia uzyskane

wartości \pm SEM zrelatywizowane do poziomu WT, nieistotne, $p > 0,05$, $n=6$ eksperymentów, obliczone za pomocą niesparowanego testu t-Studenta.

Podsumowując, powyższe wyniki nie ujawniły różnic w poziomie zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN2 w stanie podstawowym na synapsie myszy WT i *Fmr1* KO. Co istotne, podobnie jak dla NLGN1 i NLGN3 zaobserwowano spadek poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN2 w ciągu 2,5 minuty po pobudzeniu neuronalnym, co może być wynikiem obróbki proteolitycznej NLGN2. Dodatkowo, analiza porównawcza zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji NLGN2 ujawniła szybsze odzyskiwanie wewnątrzkomórkowej puli NLGN2 u myszy *Fmr1* KO, przypuszczalnie w wyniku zwiększonej translacji tych białek.

4.5. Charakterystyka cięcia proteolitycznego neuroligin

W niniejszym rozdziale przedstawiam wstępne analizy dotyczące obróbki proteolitycznej neuroligin w warunkach fizjologicznych, w synapsach uzyskanych z myszy pozbawionych ekspresji genu *Fmr1* oraz genu *Mmp-9*. Należy podkreślić, że prezentowane w tym rozdziale niniejszej pracy doktorskiej wyniki są wstępne i badania nad tym aspektem regulacji poziomu neuroligin na synapsie będą kontynuowane.

4.5.1. Zbadanie zależnego od aktywności synaptycznej cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO

Obróbka proteolityczna synaptycznych białek adhezyjnych jest bardzo istotnym, choć jeszcze nie do końca poznanym procesem, który umożliwia przebudowę kolców dendrytycznych i plastyczność synaps. Po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach obu genotypów myszy WT i *Fmr1* KO zaobserwowano pojawienie się prążka odpowiadającego przeciętemu N-końcowemu fragmentowi NLGN1 (około 95 kDa) raz równoczesne obniżenie poziomu powierzchniowej NLGN1. Spadek zewnątrzkomórkowych form po pobudzeniu neuronalnym został również wykryty dla białek NLGN3 oraz NLGN2. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerowały, że poziom ekspresji neuroligin na synapsie, poza regulacją etapu translacji przez białko FMRP, może być również kontrolowany przez proces cięcia proteolitycznego.

Żeby zweryfikować postawioną hipotezę badawczą zaplanowano za pomocą metody Western blot i przeciwciał rozpoznających domenę wewnątrzkomórkową NLGN wykryć krótki C-końcowy fragment (ang. C-terminal fragment, CTF), który pozostaje w

blonie postsynaptycznej po przecięciu białek neuroligin. Pojawienie się C-końcowego fragmentu NLGN1 po aktywacji synaptycznej zasugerowano we wcześniejszych doniesieniach (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012). Ze względu na brak dostępnych przeciwciał rozpoznających domenę zewnątrzkomórkową białka NLGN2 i NLGN3 była to jedyna możliwość zbadania tego procesu metodą Western blot. W tym celu wyizolowane z synaptoneurosomów myszy WT i *Fmr1* KO ekstrakty białkowe w stanie podstawowym oraz po stymulacji receptorów NMDA (2,5, 5, 10 i 20 minut) poddano elektroforezie SDS-PAGE w żelu o wyższej procentowości niż standardowo – 12%. To umożliwiło zatrzymanie w żelu fragmentów białka o spodziewanej niskiej masie molekularnej, rzędu około 20-30 kDa. Następnie do detekcji metodą Western blot użyto przeciwciał rozpoznających domenę cytoplazmatyczną poszczególnych izoform neuroligin.

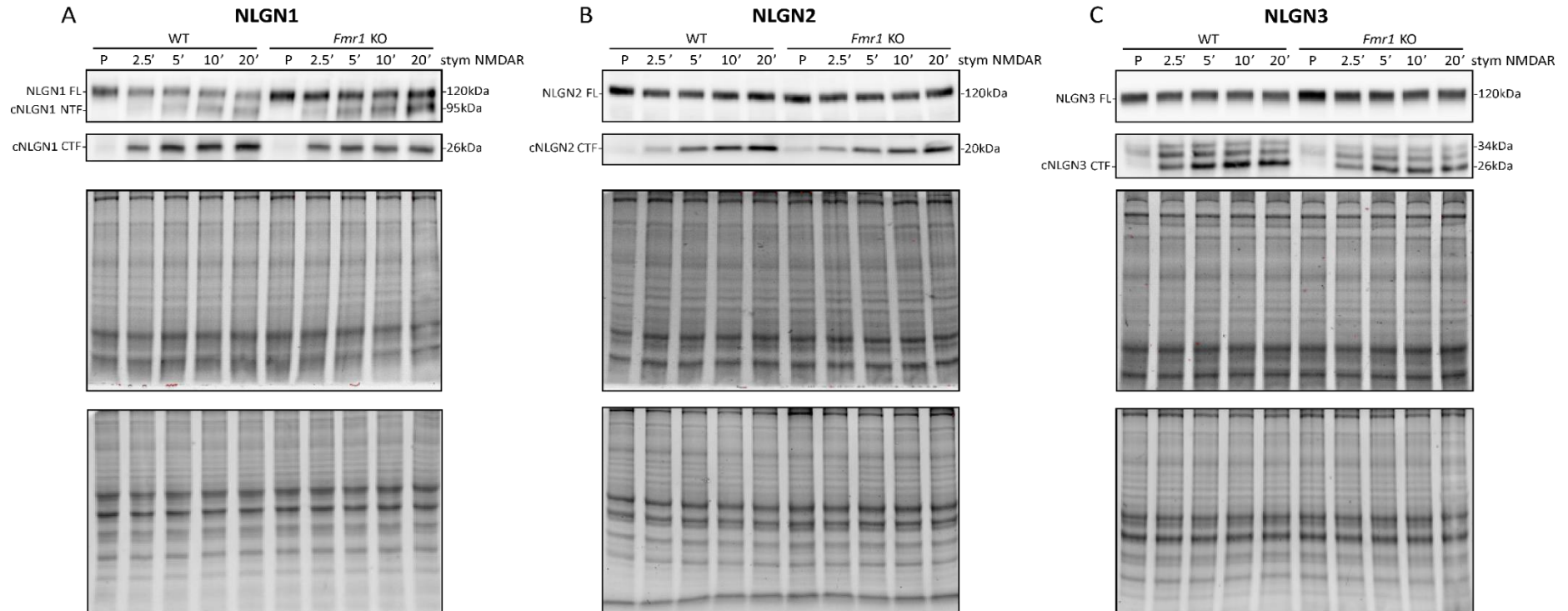
Dla każdej przeprowadzonej analizy Western blot wykonywano kontrolę równej ilości białka nałożonego na żel oraz wydajności transferu obrazując żel przed i po przeniesieniu białek na membranę za pomocą systemu do wizualizacji żeli Gel Doc XR+ (Bio-Rad). Poniżej na rycinie 46 wizualizacja żeli TGX przed przeniesieniem białek na membranę i detekcją z użyciem przeciwciał.

Jak przedstawiono na rycinie 46, zaobserwowano pojawienie się C-końcowego produktu cięcia proteolitycznego dla wszystkich form neuronalnych NLGN1, NLGN2 i NLGN3 (ang. cleaved NLGN C-terminal fragment, cNLGNs CTF) w 2,5, 5, 10 i 20 minut po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach (Rycina 46). Uzyskany wynik pozwolił na określenie wielkości odciętego fragmentu dla każdej izoformy neuroligin. Powstający prążek wskazywał na masę molekularną NLGN1 około 26 kDa (cNLGN1 CTF) oraz NLGN2 około 20 kDa (cNLGN2 CTF). W przypadku NLGN3 zaobserwowano obecność trzech prążków o masie molekularnej 34 kDa, 30 kDa i 26 kDa.

W wyniku tych eksperymentów wykazano, że w warunkach fizjologicznych w synapsie wszystkie izoformy neuroligin podlegają obróbce proteolitycznej, co stanowi oryginalne opracowanie tego tematu, gdyż nie zostało jeszcze w pełni udokumentowane przez inne grupy badawcze. Proces proteolizy następuje bardzo szybko, gdyż jest wykrywalny już w 2,5 minuty po pobudzeniu neuronalnym dla każdej z izoform neuroligin (Rycina 46). Zainicjowany proces trwa długo, gdyż produkty cięcia tych białek są wykrywalne nawet w ciągu 20 minut od aktywności synaptycznej. Proces ten prawdopodobnie stanowi niezwykle istotny aspekt regulacji poziomu neuroligin na synapsie.

Co istotne udowodniono, że proces cięcia neuroigin występuje nie tylko w warunkach fizjologicznych, ale też w synapsach myszy *Fmr1* KO. W tym przypadku proteolizie również ulegają wszystkie izoformy neuroigin: NLGN1, NLGN2 i NLGN3. Zgromadzone dane dowodzą, że analizowany proces zachodzi podobnie i nie jest zaburzony w zespole łamliwego chromosomu X.

Zależne od aktywności cięcia NLGN w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO

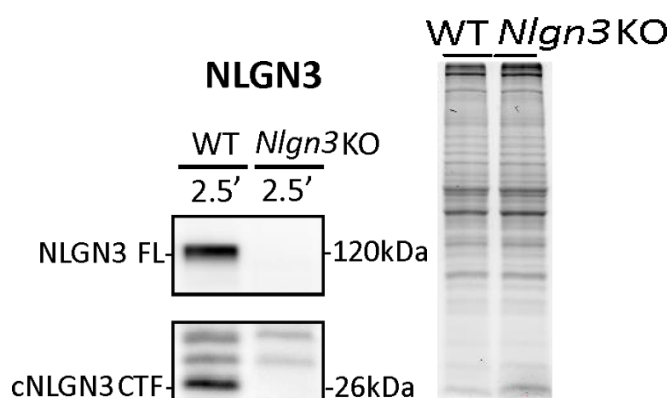


Rycina 46. Analiza Western blot prezentująca zależny od aktywności synaptycznej poziom cięcia proteolitycznego (A) NLGN1, (B) NLGN2, (C) NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min po stymulacji receptorów NMDA. Prążki na wysokości 120kDa wskazują na ilość pełnej długości NLGN1, NLGN2, NLGN3 (NLGN FL). Odcięte N-końcowe zewnątrzkomórkowe fragmenty NLGN1 mają masę molekularną około 95kDa (cNLGN1 NTF). Odcięte C-końcowe wewnątrzkomórkowe fragmenty NLGN (cNLGN CTF) wskazują na masę molekularną: NLGN1 około 26kDa, NLGN2 około 20kDa i NLGN3 około 26kDa. Poniżej kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX przed przeniesieniem białek na membranę: panel górny – żele 10%, panel dolny – żele 12%. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia z sześciu niezależnych eksperymentów.

4.5.2. Weryfikacja specyficzności przeciętych fragmentów NLGN3 z użyciem myszy *Nlgn3* KO

W przypadku analizy cięcia NLGN3 zaobserwowano obecność trzech prążków na wysokości około 34 kDa, 30 kDa i 26 kDa, powstających po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO. Od prof. Nils Brose z Instytutu Maksa Plancka w Getyndze w Niemczech uzyskano myszy pozbawione ekspresji genu *Nlgn3*, opisane po raz pierwszy w publikacji (Varoqueaux et al. 2006). Myszy *Nlgn3* KO zostały użyte w celu weryfikacji masy molekularnej odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3. Po stymulacji synaptycznej synaptoneurosomów myszy WT i *Nlgn3* KO próbki poddano analizie Western blot i detekcji NLGN3 z użyciem przeciwciała rozpoznającego domenę wewnątrzkomórkową NLGN3.

Brak prążka na wysokości około 120 kDa (NLGN3 FL) potwierdził brak ekspresji genu *Nlgn3* u myszy *Nlgn3* KO. Jak widać na rycinie 47, u myszy *Nlgn3* KO w czasie 2,5 minuty po stymulacji synaptoneurosomów nie jest obecny dolny prążek odpowiadający masie molekularnej około 26 kDa, podczas gdy jest on widoczny u myszy WT jako cNLGN3 CTF (Rycina 47).



Rycina 47. Analiza Western blot mająca na celu weryfikację specyficzności prążków reprezentujących odcięty C-końcowy fragment NLGN3 (cNLGN3 CTF) z użyciem synaptoneurosomów WT i *Nlgn3* KO w czasie 2,5 minut po aktywacji synaptycznej. Prążek widoczny w stymulowanych synaptoneurosomach WT, a nieobecny w próbkach z myszy *Nlgn3* KO wskazuje, że cNLGN3 CTF ma masę molekularną około 26 kDa.

Przeprowadzona analiza potwierdza, że fragment o masie molekularnej około 26 kDa jest specyficznym produktem cięcia NLGN3. Widoczne w tym samym panelu dwa

górne prążki (na wysokości około 30 kDa i 34 kDa) są niespecyficzne i prawdopodobnie stanowią tło pochodzące od użytego przeciwciała.

4.5.3. Próba identyfikacji proteaz odpowiedzialnych za cięcie proteolityczne neuroligin

4.5.3.1. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin *in silico*

W jedynych dotychczas badaniach analizujących udział proteaz w cięciu NLGN1 zasugerowano, że NLGN1 podlega cięciu przez dwie synaptyczne proteazy: MMP-9 (Peixoto et al 2012) oraz ADAM10 (Suzuki et al 2012). Dodatkowo, w serii eksperymentów z użyciem inhibitorów proteaz wykazano, że C-końcowy fragment NLGN1 jest cięty przez presenilinę/ γ -sekretazę (Suzuki et al 2012). Następnie pojawiły się pierwsze doniesienia na temat istotnej roli proteolizy NLGN1 i pośredniego wpływu tego procesu na komunikację i przekazanie sygnału pomiędzy komórkami nerwowymi (Gjorlund et al 2017, Korshunova et al 2015).

Uzyskane przeze mnie wyniki stanowiły dowód, że NLGN2 i NLGN3 również ulegają cięciu proteolitycznemu na synapsie, co zaobserwowano w synaptoneurosomach stymulowanych NMDA i glutaminianem w czasie 2,5, 5, 10 oraz 20 minut po stymulacji. W momencie prowadzenia tych doświadczeń nie wskazano jeszcze proteaz odpowiedzialnych za ten proces u NLGN2 i NLGN3. Zaś dla NLGN1 potwierdzono doświadczalnie poprzez mutagenezę, że NLGN1 podlega cięciu przez enzym MMP-9 w obrębie 672-695aa znajdujących się w domenie kotwiczącej (636-695aa) tego białka (Peixoto et al 2012). W celu wstępnej identyfikacji enzymów proteolitycznych, które mogą ciąć sekwencję mysich białek neuroligin przeprowadzono przyrównanie tej sekwencji NLGN1 do sekwencji NLGN2 i NLGN3 za pomocą programu Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustal/toolform.ebi), a następnie analizę *in silico* za pomocą serwera PROSPEROUS (<https://prosperous.erc.monash.edu/>). Program PROSPEROUS jest dostępnym on-line narzędziem służącym do przewidywania przypuszczalnych miejsc cięcia przez wskazane proteazy w dostarczonej sekwencji aminokwasowej (Song et al. 2018).

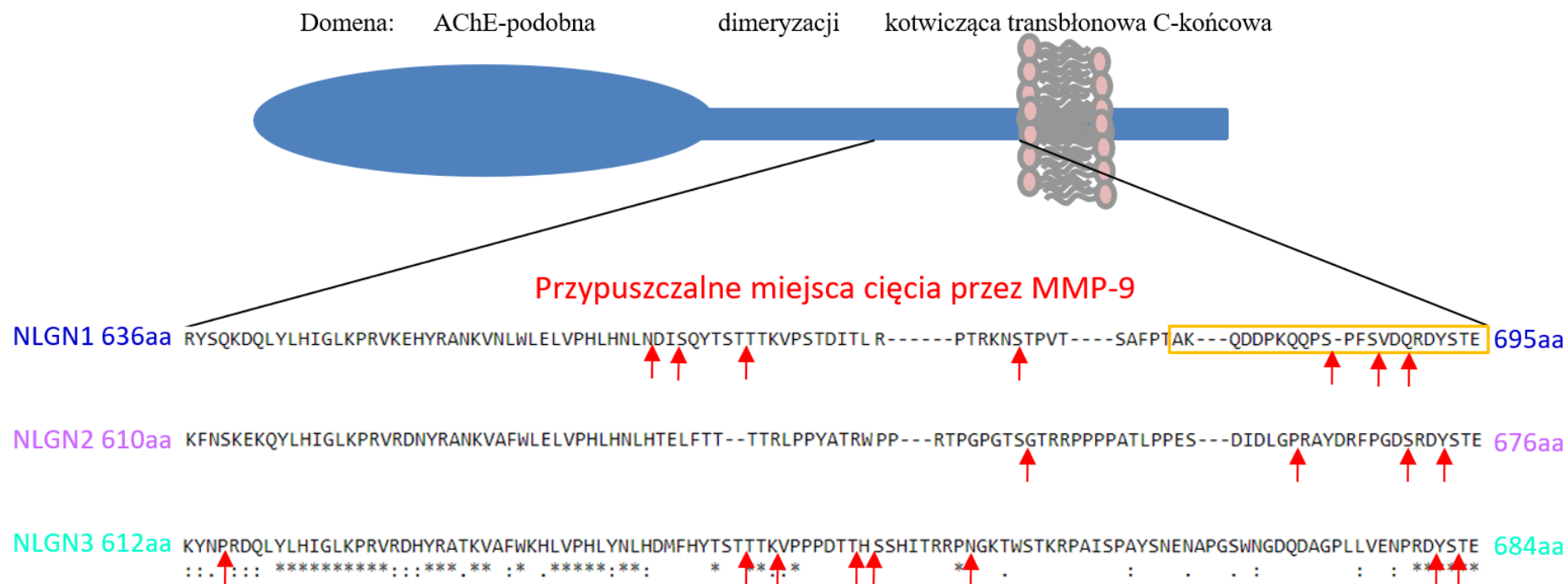
Przeprowadzona analiza wskazała na obecność kilku potencjalnych miejsc cięcia przez enzym MMP-9 (z wysoką klasyfikacją) w obrębie mysiej sekwencji domeny kotwiczącej NLGN2 (4 miejsca) i NLGN3 (8 miejsc) przyrównanych do tej domeny

NLGN1 (Tabela 11 i Rycina 48). Przypuszczalne miejsca cięcia przez MMP-9 w obrębie sekwencji potwierdzonej eksperymentalnie dla NLGN1 (672-695aa) zaznaczono w tabeli 11 pogrubionym drukiem.

Analiza *in silico* sekwencji aminokwasowej białek neuroligin potwierdziła obecność potencjalnych miejsc cięcia przez proteazę MMP-9. Niemniej jednak analizy przeprowadzone dla innych synaptycznych enzymów, takich jak na przykład MMP-2, MMP-7, MMP-13, ADAM10, ADAM17 również wskazywały na obecność miejsc cięcia (o różnej klasyfikacji) w obrębie całych sekwencji mysich białek neuroligin.

Nazwa genu	Nazwa mysiego transkryptu w bazie ensembl	Długość transkryptu (pz)	Długość białka (aa)	Przypuszczalne miejsca cięcia przez MMP9 (według rangi PROSPEROUS)
<i>Nlgn1</i>	Nlgn1-201 ENSMUST00000075054.9	4359	843	686 , 663, 638, 689 , 684 , 640, 646
<i>Nlgn2</i>	Nlgn2-201 ENSMUST00000056484.9	5003	836	640, 662, 674 , 670 ,
<i>Nlgn3</i>	Nlgn3-201 ENSMUST00000065858.2	8465	825	641, 632, 615, 680 , 631, 621, 682 , 623

Tabela 11. Przypuszczalne miejsca cięcia mysiej sekwencji aminokwasowej NLGN1, NLGN2 i NLGN3 przez enzym MMP-9 w obrębie domeny kotwiczącej, w której potwierdzono miejsce cięcia NLGN1 przez MMP-9 w sekwencji 636aa-695aa. Wskazano przypuszczalne miejsca cięcia zidentyfikowane przez serwer PROSPEROUS z najwyższą uzyskaną klasyfikacją poniżej 40.



Rycina 48. Przystawienie sekwencji domen kotwiczących NLGN1, NLGN2 i NLGN3 za pomocą serwera Clustal Omega. Potwierdzono poprzez mutagenezę, że NLGN1 podlega cięciu w obrębie 672-695aa zaznaczonych na żółto w ramce (Peixoto et al 2012). Strzałkami wskazano przypuszczalne miejsca cięcia NLGN1, a także NLGN2 i NLGN3 przez MMP-9, które zostały określone przez serwer PROPSERous w wyniku analiz *in silico*.

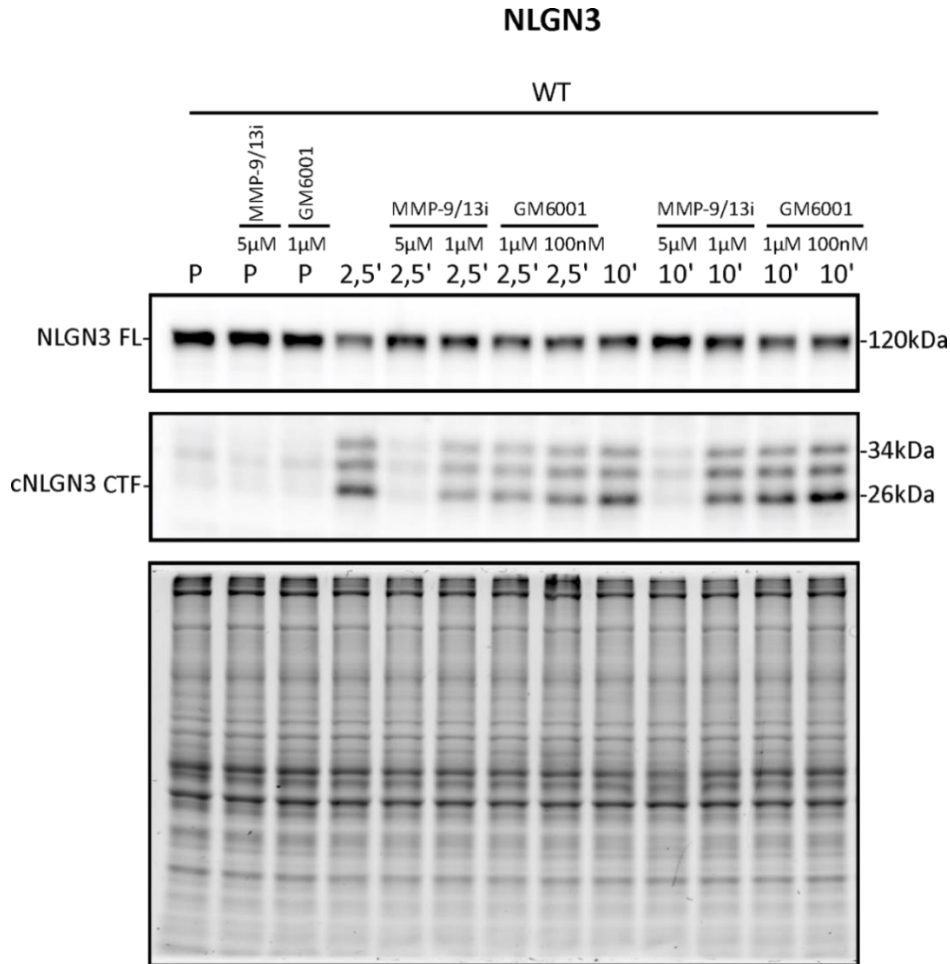
4.5.3.2. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach WT w obecności inhibitora GM6001 lub MMP-9/13

Wstępne dane na temat proteaz odpowiedzialnych za cięcie proteolityczne neuroligin zgromadzone z analiz *in silico* poddano weryfikacji *in vitro* z użyciem modelu synaptoneurosomów oraz inhibitorów proteaz. W tym celu świeżo wyizolowane synaptoneurosomy z myszy WT i *Fmr1* KO poddano stymulacji receptorów NMDA według protokołu aktywacji synaptycznej opisanego powyżej (Rycina 29 i 30). Dodatkowo, kilka próbek synaptoneurosomów inkubowano z inhibitorami synaptycznych proteaz przez 10 minut na lodzie zanim poddano je stymulacji receptorów NMDA. Inhibitory proteaz, z którymi przeprowadzono dotychczasowe wstępne analizy to: GM6001 (ogólny inhibitor metaloproteinaz MMP, #2983, Tocris Bioscience) oraz MMP-9/13i inhibitor I (hamujący aktywność enzymów MMP-9 i MMP-13, #444252, Calbiochem). Zastosowano 1 μ m i 100 nM stężenie inhibitora GM6001 oraz stężenie 5 μ m i 1 μ m w przypadku inhibitora MMP-9/13i. Do analiz wybrano czas 2,5 oraz 10 minut po aktywacji synaptycznej. Próbka kontrolna mająca na celu ocenę stanu podstawowego (P) przed stymulacją była przez cały czas inkubowana na lodzie. Następnie, próbki poddano elektroforezie białek SDS-PAGE w 12% żelu poliakrylamidowym i detekcji poziomu pełnej długości białka (NLGN FL) i odciętego C-końcowego fragmentu NLGN (cNLGN CTF) metodą Western blot.

Ze względu na doniesienia o istotnej roli odciętego fragmentu NLGN3 w rozwoju nowotworów mózgu (Venkatesh et al. 2017; Venkatesh et al. 2015) najpierw postanowiono zbadać mechanizm proteolizy NLGN3. Na rycinie 49 przedstawiono wynik dla poziomu NLGN3 pełnej długości (NLGN3 FL), i odciętych C-końcowych fragmentów NLGN3 (cNLGN3 CTF) z synaptoneurosomów z myszy o genotypie dzikim inkubowanych w obecności lub bez inhibitorów GM6001 lub MMP-9/13i, a następnie stymulowanych oraz analizowanych za pomocą metody Western blot (Rycina 49).

Jak przedstawiono na rycinie 49, inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 5 μ M przed stymulacją receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy WT całkowicie zapobiega cięciu proteolitycznemu NLGN3, co skutkuje brakiem obecności przeciętego prążka na wysokości około 26 kDa zarówno dla czasu 2,5 oraz 10 minut po stymulacji. W przypadku czasu 2,5 minut inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 1 μ M oraz

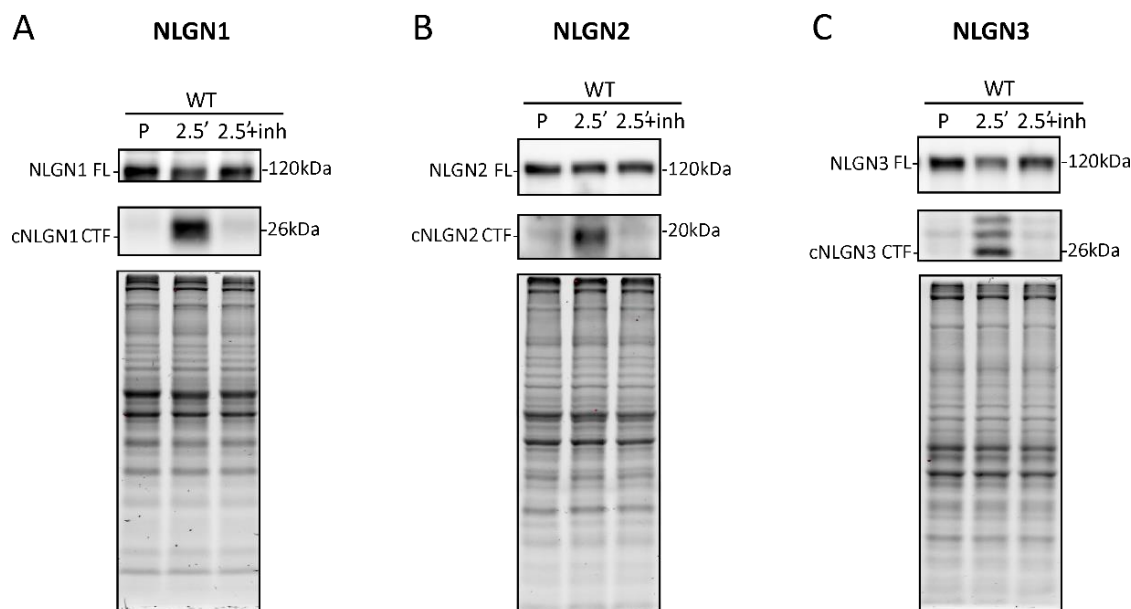
inhibitorem GM6001 w obu stężeniach powodowała zmniejszenie intensywności przeciętego prążka cNLGN3 CTF. W przypadku czasu 10 minut inkubacja z inhibitorem GM6001 w obu stężeniach nie była efektywna w hamowaniu procesu cięcia NLGN3.



Rycina 49. Analiza Western blot poziomu NLGN3 o pełnej długości (NLGN3 FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3 (cNLGN3 CTF) w synaptoneurosomach myszy WT w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2,5') oraz 10 minut po aktywacji synaptycznej (10'). Nad czasem wskazano inhibitor proteaz oraz stężenie użyte do 10 minutowej inkubacji z synaptoneurosomami na lodzie przed aktywacją synaptyczną. Sprawdzano działanie inhibitora proteaz MMP-9/13i (Calbiochem) w stężeniu 5 μM i 1 μM oraz inhibitora proteaz GM6001 (Tocris Bioscience) w stężeniu 1 μM i 100 nM. Poniżej wizualizacja poziomu białka w żelu TGX. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcie z trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów.

Na podstawie powyższej analizy można wysnuć wniosek, że w warunkach fizjologicznych NLGN3 podlega cięciu przez synaptyczne proteazy MMP-9 i/lub MMP-13. Poniżej przedstawiono analizę cięcia proteolitycznego wszystkich izoform neurologin

w czasie 2,5 minuty po stymulacji poprzedzonej inkubacją z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 5 μ M (Rycina 50). Zamieszczono też wizualizację żeli TGX w celu kontroli ilości nałożonego białka.



Rycina 50. Analiza Western blot poziomu białka neuroligin pełnej długości (NLGN FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu (cNLGN CTF) dla (A) NLGN1, (B) NLGN2, (C) NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2.5') oraz 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej poprzedzonej 10 minutową inkubacją synaptoneurosomów z inhibitorem proteaz MMP-9/13i (Calbiochem) w stężeniu 5 μ M (2.5'+inh). Poniżej kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX przed przeniesieniem białek na membranę i detekcją poziomu NLGN1, NLGN2, NLGN3 metodą Western blot. Przedstawiono przykładowe zdjęcia z trzech niezależnych eksperymentów.

Jak widać na rycinie 50, inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 5 μ M przed stymulacją całkowicie zapobiega powstaniu odciętego fragmentu (cNLGN CTF) na wysokości 26 kDa dla NLGN1, 20 kDa dla NLGN2 i 26 kDa dla NLGN3. Ponadto, poziom pełnej długości białka (NLGN FL około 120 kDa) po inkubacji z inhibitorem jest zbliżony do poziomu intensywności prążka dla stanu podstawowego (P).

Na podstawie uzyskanych wyników można niejednoznacznie stwierdzić, że proteaza MMP-9 i/lub MMP-13 ma udział w cięciu wszystkich izoform neuroligin po aktywacji synaptycznej u myszy o genotypie dzikim.

4.5.3.3. Zbadanie zależnego od aktywności synaptycznej cięcia proteolitycznego neuroligin w synaptoneurosomach myszy WT i *Mmp-9* KO

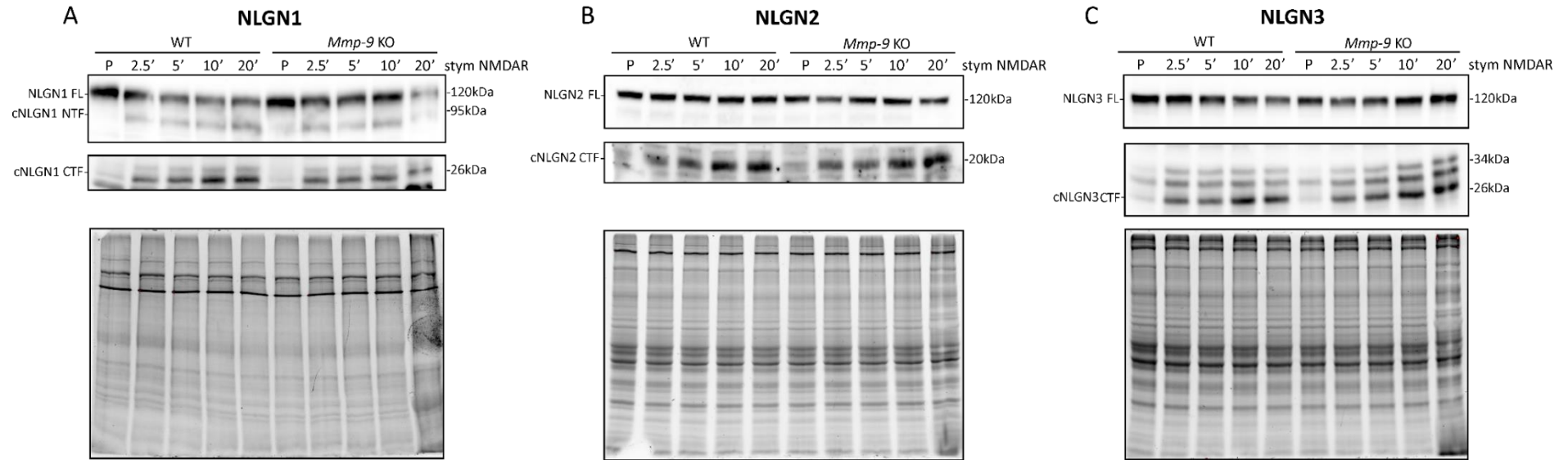
Żeby potwierdzić lub wykluczyć udział proteazy MMP-9 w procesie cięcia białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 do badań wykorzystano myszy pozbawione ekspresji genu *Mmp-9* i tym samym aktywności tej proteazy (*Mmp-9* KO) (Vu et al. 1998). Myszy *Mmp-9* KO otrzymano od dr Marzeny Stefaniuk w ramach współpracy z Zakładem Neurobiologii z Instytutu im. Marcela Nenckiego w Warszawie.

W tym celu wyizolowano synaptoneurosomy z myszy WT i *Mmp-9* KO, a ekstrakty białkowe w stanie podstawowym oraz po stymulacji receptorów NMDA (2,5, 5, 10 i 20 minut) poddano elektroforezie SDS-PAGE w 12% żelu poliakrylamidowym. Następnie, do detekcji metodą Western blot użyto przeciwciał rozpoznających domenę cytoplazmatyczną poszczególnych izoform neuroligin, żeby wykryć białko pełnej długości (NLGN FL) oraz krótki C-końcowy fragment (cNLGN CTF), który pozostaje w błonie postsynaptycznej po przecięciu białek neuroligin. Uzyskane wyniki analiz Western blot wraz kontrolą ilości białka nałożonego na żel TGX przedstawiono na rycinie 51.

Jak przedstawiono na rycinie 51, zaobserwowano spadek intensywności prążka reprezentującego NLGN pełnej długości (NLGN FL) w 2,5 minuty po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach zarówno myszy WT jak i *Mmp-9* KO. Ponadto, w przypadku NLGN1 uwidoczniło się pojawienie się N-końcowego produktu cięcia NLGN1 (cNLGN1 NTF) o masie molekularnej około 95 kDa w czasie 2,5, 5, 10 i 20 minut po stymulacji receptorów NMDA, również w przypadku obu analizowanych genotypów (Rycina 51). Co więcej, potwierdzono obecność C-końcowego produktu cięcia proteolitycznego dla wszystkich izoform neuroligin (cNLGNs CTF): NLGN1 (26 kDa), NLGN2 (20 kDa) i NLGN3 (26 kDa) w 2,5, 5, 10 i 20 minut po stymulacji receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy WT oraz *Mmp-9* KO (Rycina 51).

W wyniku przeprowadzonej analizy udało się ustalić, że u myszy pozbawionych aktywności proteazy *Mmp-9* zachodzi cięcie proteolityczne wszystkich izoform neuroligin: NLGN1, NLGN2 oraz NLGN3. Ten wynik sugeruje, że w obróbce proteolitycznej neuroligin poza enzymem MMP-9 bierze udział inna proteaza.

Zależne od aktywności cięcie NLGN w synaptoneurosomach z mózgu myszy WT i *Mmp-9* KO



Rycina 51. Analiza Western blot prezentująca zależny od aktywności synaptycznej poziom cięcia proteolitycznego (A) NLGN1, (B) NLGN2, (C) NLGN3 w synaptoneurosomach myszy WT i *Mmp-9* KO w stanie podstawowym (P) i w czasie 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min po stymulacji receptorów NMDA. Prążki na wysokości 120kDa wskazują na ilość pełnej długości NLGN1, NLGN2, NLGN3 (NLGN FL). Odcięte N-końcowe zewnątrzkomórkowe fragmenty NLGN1 mają masę molekularną około 95kDa (cNLGN1 NTF). Odcięte C-końcowe wewnątrzkomórkowe fragmenty NLGN (cNLGN CTF) wskazują na masę molekularną: NLGN1 około 26kDa, NLGN2 około 20kDa i NLGN3 około 26kDa. Poniżej kontrola ilości nałożonego białka w żelu TGX przed przeniesieniem białek na membranę i detekcją poziom NLGN1, NLGN2, NLGN3 metodą Western blot. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia z czterech niezależnych eksperymentów.

4.5.3.4. Analiza cięcia proteolitycznego neuroliginy 3 w synaptoneurosomach *Mmp-9* KO w obecności inhibitora GM6001 lub MMP-9/13

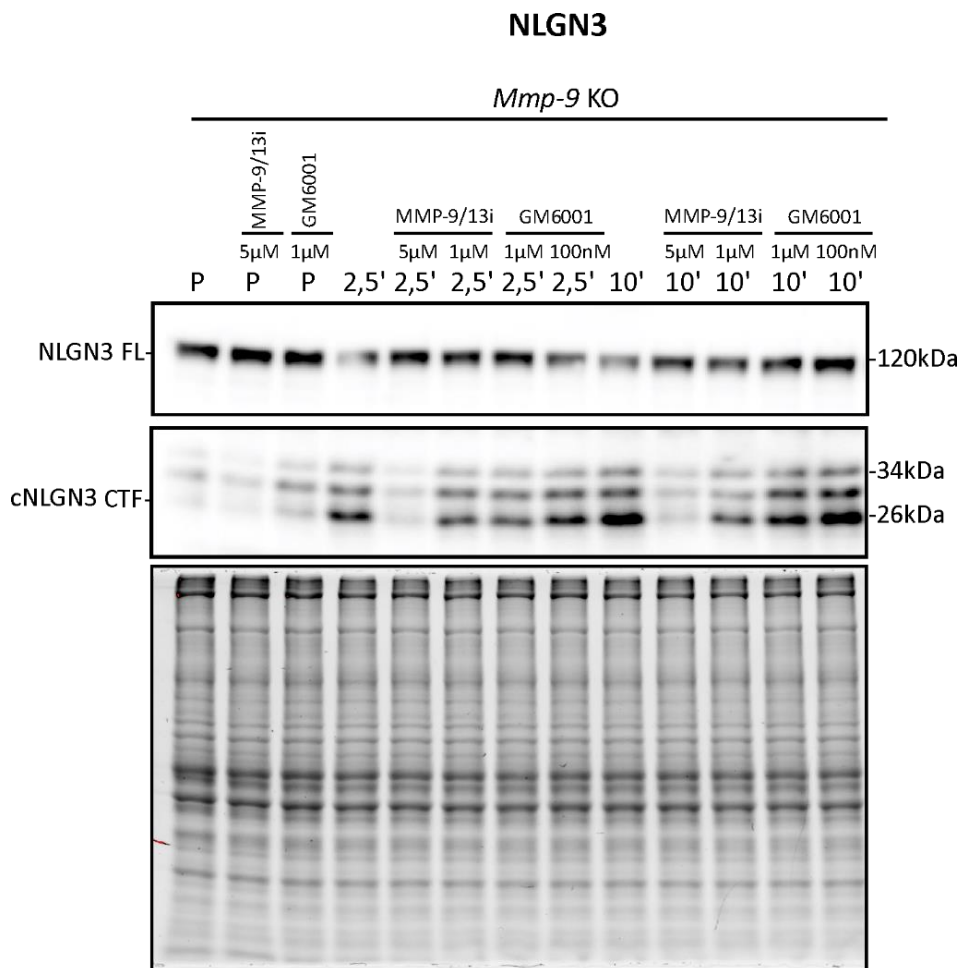
Analizy *in silico* przeprowadzone za pomocą serwera PROSPERous (<https://prosperous.erc.monash.edu/>) wykazały obecność potencjalnych miejsc cięcia w obrębie domeny kotwiczącej NLGN3 między innymi przez proteazę MMP-13. W celu weryfikacji udziału proteaz z grupy metaloproteinaz, a zwłaszcza enzymu MMP-13 w procesie cięcia NLGN3 przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem inhibitorów analogiczne do przedstawionych na rycinie 49. Tym razem dzięki uprzejmości dr Marzeny Stefaniuk z Zakładu Neurobiologii z Instytutu im. Marcela Nenckiego w Warszawie do doświadczeń wykorzystano myszy *Mmp-9* KO (Rycina 52).

Synaptoneurosomy myszy *Mmp-9* KO inkubowano na lodzie przez 10 minut z inhibitorem GM6001 (#2983, Tocris Bioscience) w stężeniu 1 μM i 100 nM lub inhibitorem MMP-9/13i (#444252, Calbiochem) w stężeniu 5 μM i 1 μM . Następnie synaptoneurosomy poddano stymulacji receptorów NMDA i inkubacji w 37°C z wytrząsaniem przez 2,5 lub 10 minut. W celu oceny stanu podstawowego (P) próbka kontrolna była inkubowana cały czas na lodzie. Następnie, próbki poddano elektroforezie białek SDS-PAGE w 12% żelu poliakrylamidowym i detekcji poziomu pełnej długości białka NLGN3 (NLGN3 FL) i odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3 (cNLGN3 CTF) metodą Western blot (Rycina 52).

Jak pokazano na rycinie 52, inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 5 μM przed stymulacją receptorów NMDA w synaptoneurosomach myszy *Mmp-9* KO skutecznie zapobiega cięciu proteolitycznemu NLGN3, co skutkuje brakiem obecności przeciętego prążka na wysokości około 26 kDa zarówno dla czasu 2,5 oraz 10 minut po stymulacji. Inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i w stężeniu 1 μM oraz inhibitorem GM6001 w stężeniu 1 μM powodowała zmniejszenie intensywności przeciętego prążka cNLGN3 CTF w obu analizowanych jednostkach czasowych. Z kolei, inkubacja z inhibitorem GM6001 w stężeniu 100 nM nie skutkowała zahamowaniem procesu cięcia NLGN3 w czasach 2,5 minuty oraz 10 minut po stymulacji receptorów NMDA (Rycina 52).

W powyższej analizie potwierdzono, że w synaptoneurosomach myszy pozbawionych aktywności proteazy *Mmp-9* zachodzi cięcie NLGN3, co dowodzi, iż

NLGN3 musi być cięta przez inny enzym. Po pierwsze, zaobserwowano, że inkubacja z inhibitorem GM6001 w stężeniu 1 μM częściowo hamuje proces cięcia NLGN3. Po drugie, wykazano, że inkubacja z inhibitorem MMP-9/13i prowadzi do całkowitego zahamowania procesu cięcia NLGN3, co wskazuje na znaczący udział proteazy MMP-13 w obróbce proteolitycznej NLGN3.



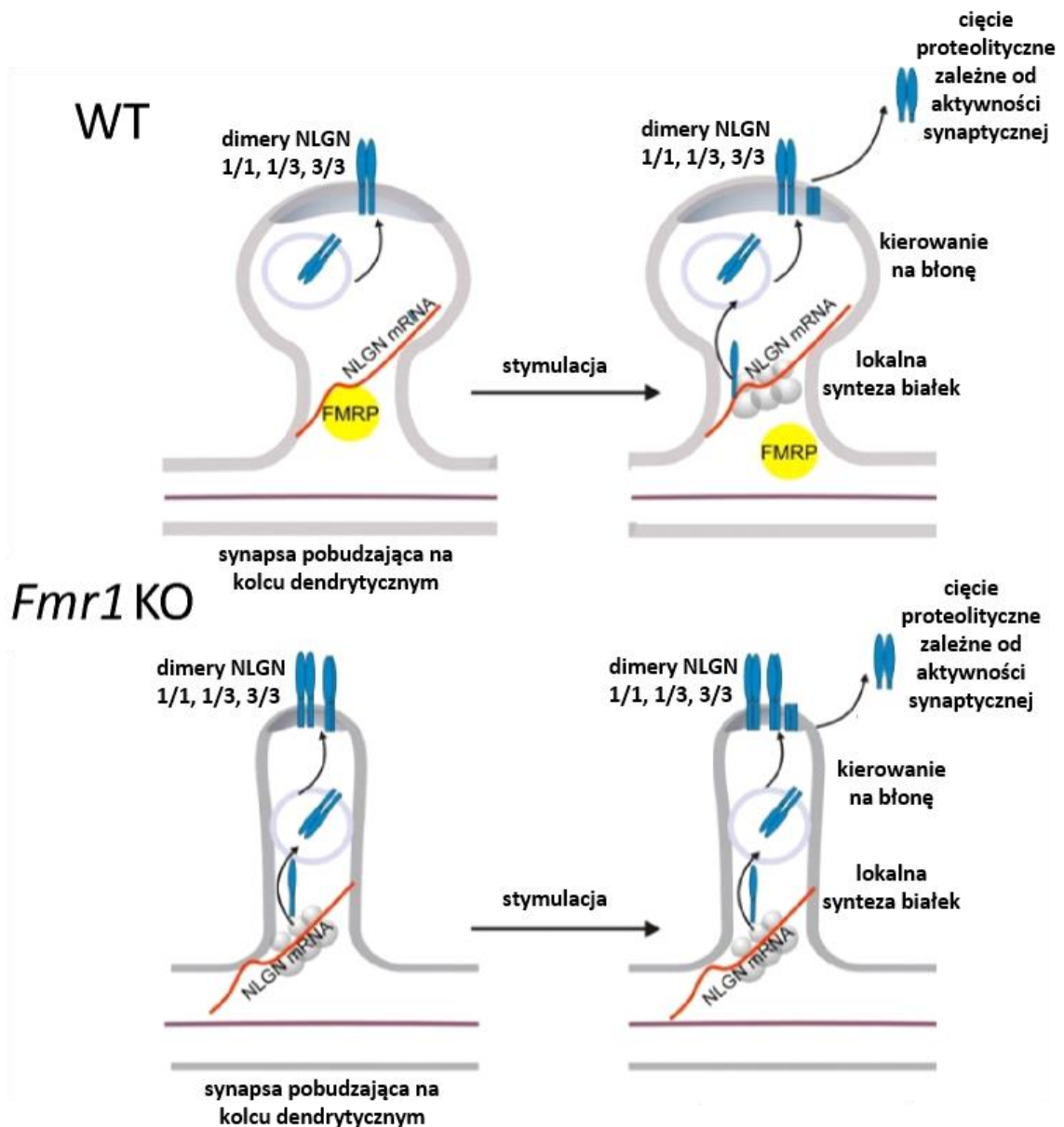
Rycina 52. Analiza Western blot poziomu NLGN3 o pełnej długości (NLGN3 FL) oraz odciętego C-końcowego fragmentu NLGN3 (cNLGN3 CTF) w synaptoneurosomach myszy *Mmp-9* KO w stanie podstawowym (P), 2,5 minuty po aktywacji synaptycznej (2,5') oraz 10 minut po aktywacji synaptycznej (10'). Nad czasem wskazano inhibitor proteaz oraz stężenie użyte do 10 minutowej inkubacji z synaptoneurosomami na lodzie przed aktywacją synaptyczną. Sprawdzano działanie inhibitora proteaz MMP-9/13i (Calbiochem) w stężeniu 5 μM i 1 μM oraz inhibitora proteaz GM6001 (Tocris Bioscience) w stężeniu 1 μM i 100 nM. Poniżej wizualizacja poziomu białka w żelu TGX. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcie z trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów.

4.6. Podsumowanie uzyskanych wyników

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie molekularnych mechanizmów regulujących poziom neurologin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X.

Pierwszym celem badań była ocena poziomu ekspresji neurologin (mRNA oraz białka) w synaptoneurosomach myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO. Ocenę poziomu białka neurologin przeprowadzono również w pierwotnych hodowlach neuronalnych. Udowodniono, że poziom białka NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w synapsie myszy *Fmr1* KO, podczas gdy poziom mRNA się nie różni. To zadanie było kluczowe, gdyż pozwoliło sformułować tezę, że podwyższony poziom neurologin jest wynikiem zwiększonej translacji synaptycznej tych białek u myszy *Fmr1* KO. Kolejnym celem badań było zbadanie interakcji białka FMRP z mRNA neurologiny 1, 2 i 3. Za pomocą metody współwytrącania RNA oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazano, że białko FMRP oddziałuje z mRNA wszystkich izoform neurologin – 1, 2, 3. Następnie używając metody chemicznego sieciowania białek powierzchniowych przeprowadzono charakterystykę zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji neurologiny 1, 2 oraz 3 w części wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej synapsy. Te badania wykazały, że brak FMRP w zespole łamliwego chromosomu X prowadzi do zwiększonej inkorporacji neurologiny 1 oraz 3 do błony postsynaptycznej. Ponadto, dowiedziono, iż wszystkie izoformy neurologin ulegają cięciu proteolitycznemu na synapsie w warunkach fizjologicznych. Proces obróbki proteolitycznej neurologin jest zależny od aktywacji synaptycznej i następuje już w ciągu 2,5 minut po pobudzeniu neuronalnym. Co więcej, wykazano, że cięcie proteolityczne występuje też u myszy *Fmr1* KO, co sugeruje, że ten proces nie jest zaburzony w zespole łamliwego chromosomu X. W końcowym etapie badań podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów regulujących poziom neurologin w synapsie. W tym celu przeprowadzono wstępną identyfikację proteaz odpowiedzialnych za cięcie neurologin w synaptoneurosomach. Wyniki tych eksperymentów wskazują na udział proteazy MMP-13 w obróbce proteolitycznej białek neurologin.

Na rycinie 53, schematycznie przedstawiono model podsumowujący najważniejsze wyniki uzyskane podczas realizacji projektu doktorskiego. W synapsach pobudzających w warunkach fizjologicznych białko FMRP oddziałuje z mRNA neurologiny 1, 2, 3 i reguluje ich lokalną translację w synapsie. Pod wpływem aktywacji synaptycznej białko



Rycina 53. Schemat przedstawiający zależną od aktywności dystrybucję NLGN1 i NLGN3 w synapsach glutaminergicznych myszy WT i *Fmr1* KO. Model przedstawia lokalną syntezę białek NLGN1 i NLGN3, transport na błonę postsynaptyczną i cięcie proteolityczne na synapsie w odpowiedzi na aktywację synaptyczną. Brak FMRP u myszy *Fmr1* KO prowadzi do zwiększonego kierowania NLGN1 i NLGN3 na błonę postsynaptyczną. Stymulacja synaptyczna prowadzi do szybkiego cięcia proteolitycznego NLGN1 i NLGN3 zarówno w synapsach WT, jak i *Fmr1* KO.

FMRP oddysocjowuje od mRNA neurologin i umożliwia syntezę ich białka w kolcu dendrytycznym. W pęcherzykach synaptycznych następuje dimeryzacja neurologin, a

następnie kierowanie dimerów NLGN1 i NLGN3 (NLGN1/NLGN1, NLGN3/NLGN3, NLGN1/NLGN3) na błonę postsynaptyczną. W wyniku pobudzenia neuronalnego w bardzo krótkim czasie następuje cięcie proteolityczne neuroligin skutkujące powstawaniem krótkiego C-końcowego fragmentu białka w błonie oraz jednego lub więcej N-końcowych fragmentów zewnątrzkomórkowych. W zespole łamliwego chromosomu X, brak białka FMRP skutkuje brakiem regulacji translacji neuroligin w synapsie, co prowadzi do podwyższonej produkcji białek NLGN1 i NLGN3 oraz ich zwiększonej inkorporacji do błony postsynaptycznej. Niemniej jednak, w synapsach myszy *Fmr1* KO proces cięcia neuroligin nie jest zaburzony, dzięki czemu możliwa jest regulacja ich poziomu oraz plastyczność synaptyczna (Rycina 53) (Chmielewska et al. 2019).

Wyniki mojej pracy doktorskiej poszerzają wiedzę na temat funkcjonowania synapsy w warunkach fizjologicznych. Wnosząc wkład do dotychczasowej wiedzy o regulacji ekspresji neuroligin na poziomie molekularnym przez białko FMRP oraz cięcie proteolityczne, mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia podłoża zespołu łamliwego chromosomu X, autyzmu, innych chorób związanych z dysfunkcją synaps, a nawet nowotworów mózgu. Ponadto, w przyszłości w połączeniu z wynikami innych grup badawczych rezultaty tych badań mogą stanowić część składową do opracowania strategii terapeutycznych.

5. Dyskusja

Pomimo wielu lat badań nad podłożem zespołu łamliwego chromosomu X wciąż nie został poznany molekularny mechanizm zmian zachodzących na poziomie komórkowym pozwalający na zaproponowanie odpowiedniej strategii terapeutycznej i efektywnego leczenia (Berry-Kravis et al. 2018; Salcedo-Arellano, Hagerman, and Martinez-Cerdeno 2020; Thomson et al. 2017). Przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych badania kliniczne nie przyniosły pozytywnych rezultatów pozwalających na wprowadzenie terapii dla pacjentów z FXS (Jacquemont et al. 2014). Ponieważ nieprawidłowa ekspresja neuroligin jest przyczyną zaburzeń ze spektrum autyzmu (Cao and Tabuchi 2017), celem mojego projektu doktorskiego było zbadanie wpływu braku białka FMRP na poziom neuroligin.

Zaburzenia w regulacji poziomu białek synaptycznych mogą prowadzić do dysfunkcji synaps (Ramocki and Zoghbi 2008). Neuroliginy są niezwykle ważnymi białkami adhezyjnymi zapewniającymi połączenie pomiędzy komórkami nerwowymi (Craig and Kang 2007). Badania ostatnich lat wskazują również na kluczową funkcję neuroligin w przekazywaniu sygnału (Jang, Lee, and Kim 2017). Wykazano, że mutacje w genach neuroligin korelują z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu (Laumonier et al. 2004; Jamain et al. 2003; Cao and Tabuchi 2017). Badania na poziomie molekularnym wykazały, że odkryte mutacje upośledzają synaptyczną lokalizację neuroligin oraz skutkują nieprawidłowym przewodnictwem synaptycznym (Chih et al. 2004; Chanda et al. 2016; Zhang et al. 2009; De Jaco et al. 2006; Tabuchi et al. 2007; Etherton, Tabuchi, et al. 2011; Cao and Tabuchi 2017; Comoletti et al. 2004).

Co więcej, niedawno pojawiły się doniesienia na temat procesu cięcia proteolitycznego neuroligin, który może być czynnikiem regulującym poziom neuroligin na synapsie (Venkatesh et al. 2017; Bembem et al. 2019). Dotychczas wykazano, że NLGN1 ulega cięciu przez dwie proteazy synaptyczne: MMP-9 oraz ADAM-10 (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012). Ponadto, dowiedziono, że przecięty fragment NLGN3 jest mitogenem stymulującym wzrost nowotworów mózgu (Venkatesh et al. 2015). Niemniej jednak dokładny mechanizm obróbki proteolitycznej neuroligin pozostawał nieznanym, tak samo jak proteazy uczestniczące w procesie cięcia innych izoform neuroligin.

W świetle powyższych danych, uzyskanie wiedzy na temat molekularnych podstaw regulacji ekspresji neurologin – genów związanych zarówno z autyzmem jak i nowotworami – w synapsie wydawało się niezwykle istotne.

Myszy z nadekspresją NLGN1 wykazują istotne deficyty w zapamiętywaniu informacji, mają zmienioną morfologię kolców dendrytycznych i zaburzoną indukcję długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w hipokampie (Dahlhaus et al. 2010). Z drugiej strony, niektóre mutacje w genach *Nlgn* związane z zaburzeniami ze spektrum autyzmu prowadzą do retencji neurologin wewnątrz synapsy (Chih et al. 2004; Chanda et al. 2016; Comoletti et al. 2004; Cao and Tabuchi 2017). Z kolei, myszy pozbawione ekspresji genu *Nlgn1* wykazują upośledzenie przestrzennego uczenia się, pamięci oraz zaburzenia w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym w hipokampie i stosunku receptorów NMDA do AMPA w synapsach zapewniających połączenie pomiędzy korą mózgową a prążkowiem (Blundell et al. 2010). Po utworzeniu synapsy pobudzającej, oddziaływanie białek NLGN i NRXN prowadzi do rekrutacji PSD-95 oraz pośrednio do rekrutacji receptorów NMDA i AMPA do gęstości postsynaptycznej (Krueger et al. 2012). Zatem poziom neurologin na synapsie musi być ściśle i precyzyjnie regulowany, co jest istotne dla zapewnienia integralności synaps, zwłaszcza ze względu na ich rolę w rekrutacji receptorów dla glutaminianu w synapsach pobudzających (Mondin et al. 2011; Chanda et al. 2016; Etherton, Tabuchi, et al. 2011; Krueger et al. 2012). Przykładowo, oddziaływanie NLGN1 z receptorem NMDA udowodniono dla następujących rejonów mysiego mózgu: hipokamp (Budreck et al. 2013; Blundell et al. 2010; Jiang et al. 2017; Shipman and Nicoll 2012; Shipman et al. 2011; Jedlicka et al. 2015), kora mózgowia (Kwon et al. 2012), prążkowie (Espinosa et al. 2015), ciało migdałowe (Jung et al. 2010) i mózdzek (Zhang and Sudhof 2016). Ostatnio sugeruje się również bezpośrednie oddziaływanie NLGN z receptorami dla glutaminianu NMDA i AMPA (Jang, Lee, and Kim 2017). Coraz więcej doniesień wskazuje, że uliniowanie białek pre- i postsynaptycznych, w tym receptorów AMPA przez NLGN1 bezpośrednio wpływa na wydajność transmisji synaptycznej (Haas et al. 2018; Chamma et al. 2016). Powyższe dane dowodzą, że oddziaływanie białek adhezyjnych takich jak neurologiny z receptorami ma kluczowe znaczenie dla stabilności całego kompleksu białek synaptycznych i kontroli siły przewodnictwa synaptycznego (Jang, Lee, and Kim 2017; Krueger et al. 2012).

W powyższym kontekście, odkryty w badaniach zwiększony poziom białek NLGN1 i NLGN3 w synapsach myszy *Fmr1* KO jest kolejnym molekularnym mechanizmem przyczyniającym się do fenotypu zespołu łamliwego chromosomu X. Jednak nie można wykluczyć, że zwiększona inkorporacja synaptyczna NLGN1 i NLGN3 u myszy *Fmr1* KO może również wynikać z rozregulowanej ekspresji białek kontrolujących transport synaptyczny neurologin w kierunku synaps.

5.1. Ocena poziomu ekspresji neurologin w mózgu myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO

Poza uzyskaniem wiedzy na temat funkcjonowania synapsy w warunkach fizjologicznych badano również molekularne podłoże zespołu łamliwego chromosomu X. Dlatego modelem badawczym były myszy pozbawione ekspresji genu *Fmr1* (*Fmr1* KO). Myszy *Fmr1* KO są bardzo dobrze opisanym modelem rekapitulującym symptomy ludzkiej choroby (Leung and Jia 2016; Kazdoba et al. 2014; Krueger et al. 2011).

Ważną częścią mojego projektu było sprawdzenie czy neurologiny ulegają lokalnej translacji w synapsie oraz czy ten proces jest regulowany przez białko FMRP. Sprawdzone modelem doświadczalnym do badania procesu synaptycznej translacji są synaptoneurosomy, czyli wzbogacona w białka synaptyczne frakcja połączonych ze sobą pęcherzyków pre- i postsynaptycznych izolowanych z mózgu myszy (Kuzniewska et al. 2018). Synaptoneurosomy stanowią model „wyizolowanej synapsy”, który był z powodzeniem wykorzystywany we wcześniejszych badaniach prowadzonych przez nasz zespół badawczy (Dziembowska et al. 2012; Janusz et al. 2013; Jasinska et al. 2016; Kuzniewska et al. 2018; Chmielewska et al. 2019; Kuzniewska et al. 2020). Synaptoneurosomy były izolowane z hipokampa oraz części przyległej kory mózgowej z obu półkul mózgu myszy. Te struktury zostały wybrane celowo by zachować kluczowe połączenia korowo-hipokampalne oraz ze względu na rolę, jaką pełni hipokamp w procesie uczenia się i zapamiętywania.

Uzyskane w projekcie wyniki analiz przeprowadzonych z użyciem synaptoneurosomów i pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych wskazują na podwyższony poziom synaptycznych białek NLGN1 i NLGN3 u myszy *Fmr1* KO w warunkach podstawowych. Na podstawie powyższych odkryć postuluję, że przyczyną tego dotychczas nieudokumentowanego fenotypu molekularnego zespołu łamliwego

chromosomu X jest brak białka FMRP i zaburzona regulacja syntezy białek neuroligin. Do tej pory poziom neuroligin analizowano tylko w całkowitych ekstraktach z różnych regionów mózgu myszy i wykazano, że jest obniżony w hipokampie i mózdzku dla NLGN1, podczas gdy nie stwierdzono zmian w poziomach NLGN2 i NLGN3 u myszy *Fmr1* KO (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Jednak podwyższony poziom białek NLGN1, NLGN2, NLGN3 i NLGN4 został wykryty w innych genetycznych modelach rozregulowania translacji. U myszy pozbawionych ekspresji genu β -*eIF4E* (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji) lub genu *4E-BP2* (białka wiążącego 2 eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E) zaobserwowano wzmożoną zależną od czynnika eIF4E translację mRNA wszystkich transkryptów *Nlgns* w hipokampalnych frakcjach synaptosomalnych (Gkogkas et al. 2013). Wykazano również, że ekspresja NLGN1 jest regulowana na etapie inicjacji translacji przez *4E-BP1* (białko wiążące 1 eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E) w synapsach rdzenia kręgowego (Khoutorsky et al. 2015). Powyższe dane dowodzą, że synteza białek neuroligin jest regulowana w synapsie na poziomie postranskrypcyjnym przez białko FMRP i inicjację translacji.

Nie wykryto podwyższonego poziomu białka NLGN2 w synaptoneurosomach i pierwotnych hodowlach hipokampalnych z myszy *Fmr1* KO, choć wykazano, że białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w celu regulacji ich synaptycznej translacji. Ta zmienność może wynikać z faktu, iż poziom mRNA *Nlgns* był badany za pomocą niezwykle czulej metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Do detekcji białka NLGNs zastosowano metodę Western blot, która jest mniej czułą techniką niż qRT-PCR. Rozbieżność ta może być również związana ze specyficzną ekspresją NLGN2 w synapsach hamujących, które są mniej liczne w neuronach korowych i hipokampalnych gryzoni (Gulyas et al. 1999; Chen et al. 2012; Megias et al. 2001). Wykazano, że synaptoneurosomy zawierają zarówno synapsy pobudzające, jak i hamujące, oraz że podczas procedury preparatywnej są one podobnie wzbogacane (Rycina 17 i 20). Frakcja synaps hamujących zawierających NLGN2 w synaptoneurosomach może być zbyt mała, aby móc ilościowo wykryć różnice w ekspresji NLGN2 pomiędzy synaptoneurosomami myszy WT i *Fmr1* KO. Nie można również wykluczyć możliwości, że białko NLGN2 ulega specyficznej lub szybszej degradacji niż białka NLGN1 i NLGN3. Jednakże na

obecną chwilę niewiele wiadomo na temat regulacji lokalnej degradacji białek w synapsie.

Pomimo, iż synaptoneurosomy wydają się być optymalnym preparatem do badania procesu synaptycznej translacji to nie ma gwarancji, że analizując poziom białek neuroligin w synaptoneurosomach uzyskano obraz specyficzny wyłącznie dla neuronów (Gulyassy et al. 2020). Jak wiadomo, według teorii synapsy trójdzielnej, integralną część synapsy stanowią wypustki astrocytów (Perea, Navarrete, and Araque 2009; Hasan and Singh 2019). Niedawno udowodniono, że komórki glejowe jak na przykład astrocyty również zawierają neuroliginy (Stogsdill et al. 2017; Sakers and Eroglu 2019). Nie można więc wykluczyć, iż jakiś procent prezentowanego poziomu neuroligin w synaptoneurosomach stanowią neuroliginy pochodzące z astrocytów (Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2016). Powyższe zastrzeżenie dotyczy również poziomu białek neuroligin, który analizowany był w pierwotnych hodowlach hipokampalnych. Pomimo, iż w pierwszych dniach hodowli dodawany był odczynnik AraC, który ma zapobiegać „przerośnięciu” hodowli neuronów komórkami glejowymi to w tym przypadku jest pewne, że neuronom w hodowli *in vitro* towarzyszyły astrocyty (Araque et al. 1999; Singh et al. 2016).

5.4. Ocena oddziaływania białka FMRP z mRNA neuroligin

We wcześniejszych badaniach wykorzystujących metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA i techniki proteomiczne zidentyfikowano dużą liczbę transkryptów, których translacja jest regulowana przez białko FMRP w mózgu myszy (Darnell et al. 2011; Liao et al. 2008). Wśród nich można wyróżnić wiele białek należących do grupy tzw. kluczowych organizatorów synaps, takich jak neuroliginy, ale także neureksyny, protokadheryny, kadheryny, kontaktyny czy białka SHANK (Shahar and Schuman 2020). Powyższe białka są odpowiedzialne m.in. za utworzenie i utrzymanie funkcjonalnej synapsy (Dorrbaum et al. 2020; Thoumine et al. 2008). Opublikowane dane wskazują, że białko FMRP kontroluje translację całej grupy transkryptów uznawanych za niezbędne do prawidłowego funkcjonowania synaps i sugerują, które z genów mogą być odpowiedzialne za dysfunkcje synaps obserwowane w zespole łamliwego chromosomu X (Darnell and Klann 2013; Hooshmandi, Wong, and Khoutorsky 2020; Bhakar, Dolen, and Bear 2012).

W trakcie prowadzenia badań opublikowane były dwa doniesienia wskazujące na interakcję transkryptów neurologin z białkiem FMRP w mózgu myszy. Jedna grupa badawcza sugerowała, że białko FMRP może oddziaływać z mRNA *Nlgn2* i *Nlgn3* (Darnell et al. 2011), a drugi zespół wskazywał na interakcję białka FMRP z mRNA *Nlgn1* i *Nlgn2* (Dahlhaus and El-Husseini 2010). Poza tymi dwoma publikacjami nie było innych dowodów potwierdzających tę interakcję. Co istotne, nie badano wcześniej oddziaływania FMRP z mRNA *Nlgn* specyficznie w synapsie oraz w odpowiedzi na stymulację. Ten niezbadany dotąd aspekt regulacji ekspresji neurologin został podjęty jako tematyka badawcza niniejszej pracy doktorskiej.

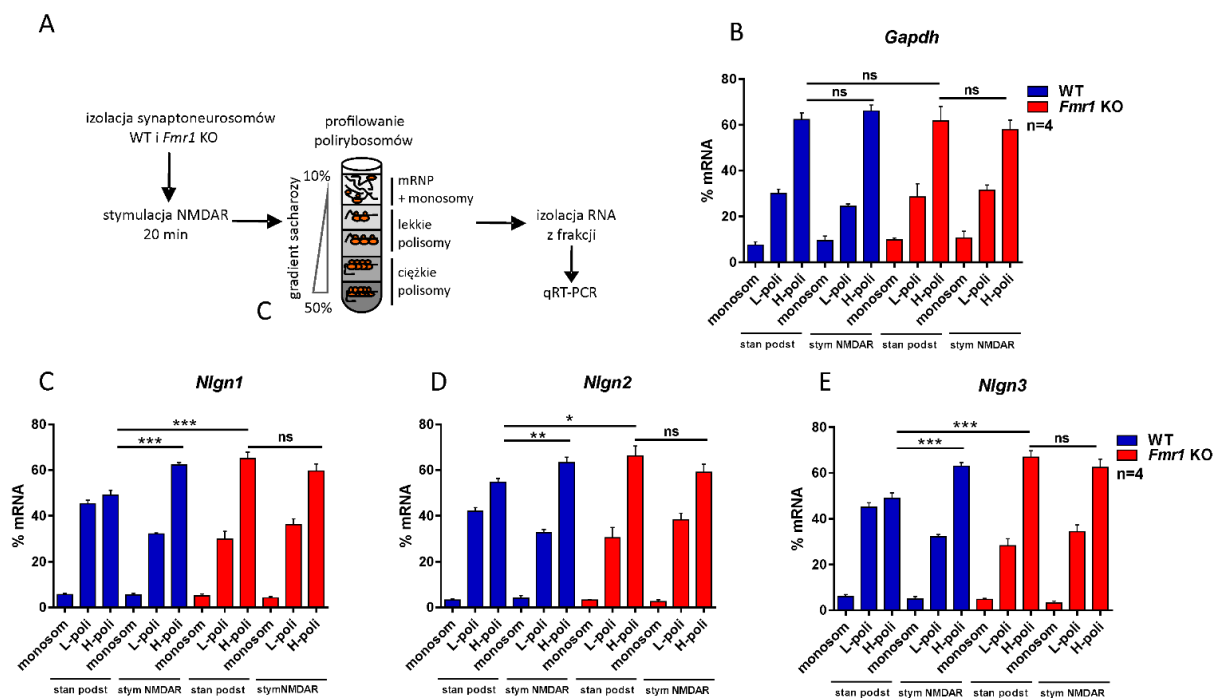
Białko FMRP zawiera domenę RGG, która wiąże sekwencje mRNA zdolne do utworzenia drugorzędowej struktury G-kwartetu (Darnell et al. 2011; Darnell, Mostovetsky, and Darnell 2005; Chen and Joseph 2015; Dahlhaus and El-Husseini 2010). Żeby zidentyfikować te sekwencje w ludzkich, mysich i szczurzych transkryptach *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* przeprowadzono analizę *in silico* (Kikin, D'Antonio, and Bagga 2006). Uzyskane wyniki wskazały na występowanie wielu takich miejsc w sekwencji transkryptów trzech neurologin w trzech analizowanych organizmach. Sekwencje bogate w guaninę były zlokalizowane zarówno w sekwencjach regulatorowych 5' UTR, sekwencji kodującej genu (CDS) oraz 3' UTR transkryptów neurologin, co jest zgodne z poprzednimi doniesieniami (Darnell et al. 2011). Uzyskane dane porównano ze sobą, by uzyskać jak najpełniejszą informację na temat sekwencji silnie zachowanych w ewolucji, do których mogłoby się wiązać białko FMRP. To pozwoliło wytypować sekwencje istotne dla wszystkich trzech gatunków, by móc ekstrapolować wyniki uzyskane na modelach mysich i szczurzych również na sekwencje ludzkie. Jednakże, warto zaznaczyć, iż mysie transkrypty neurologin mają o wiele dłuższe sekwencje 3' UTR niż transkrypty szczurze czy ludzkie. To może świadczyć o tym, iż do regulacji ekspresji mysich transkryptów neurologin konieczne jest więcej sekwencji regulatorowych, które znajdują się w tym regionie. Jednakże te mechanizmy regulacji ekspresji neurologin u myszy nie zostały jeszcze poznane.

Do fragmentów transkryptów neurologin, które zawierały sekwencje zdolne do utworzenia struktury G-kwartetu wskazane przez program QGRS Mapper zaprojektowano sondy do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Metodę FISH połączono z barwieniem fluorescencyjnym i immunodetekcją białka FMRP w celu wizualizacji

współwystępowania mRNA poszczególnych neurologin i białka FMRP w neuronach. Obrazowanie neuronów hipokampalnych w szczurzej pierwotnej hodowli wykazało częściowe współwystępowanie każdej izoformy mRNA *Nlgn*s z białkiem FMRP w dendrytach, co wskazuje na ich oddziaływanie. Warto podkreślić, że oddziaływanie mRNA neurologin z białkiem FMRP nie zostało jeszcze nigdy udokumentowane, zatem jesteśmy pierwszymi, którzy zwizualizowali współwystępowanie tych cząsteczek w hodowlach neuronalnych.

Mam świadomość, że doskonałym uzupełnieniem i kontynuacją tych badań byłoby przedstawienie dynamiki oddziaływania tych cząsteczek w formie ilościowej. Takie opracowanie tego tematu pozwoliłoby odpowiedzieć np. na pytanie czy białko FMRP oddysocjowuje od mRNA neurologin po stymulacji neuronalnej. Wizualizację tego procesu można by uzyskać za pomocą przedstawionych przeze mnie metod połączonych z uprzednią stymulacją neuronów w hodowli. Dodatkowo, wykorzystując obecnie dostępne jeszcze nowsze technologie warto byłoby zwizualizować transkrypty *Nlgn* w neuronach za pomocą wysokorozdzielczej metody detekcji pojedynczych cząsteczek mRNA (single molecule FISH, smi-FISH).

W celu zbadania oddziaływania białka FMRP z mRNA neurologin bezpośrednio w synapsach użyto bardziej specyficznego modelu – synaptoneurosomów izolowanych z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO. Za pomocą metody współwytrącania RNA z białkiem FMRP w synaptoneurosomach z myszy WT i *Fmr1* KO potwierdzono obecność mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* w kompleksie z białkiem FMRP. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały, że białko FMRP może regulować lokalną synaptyczną translację neurologin.



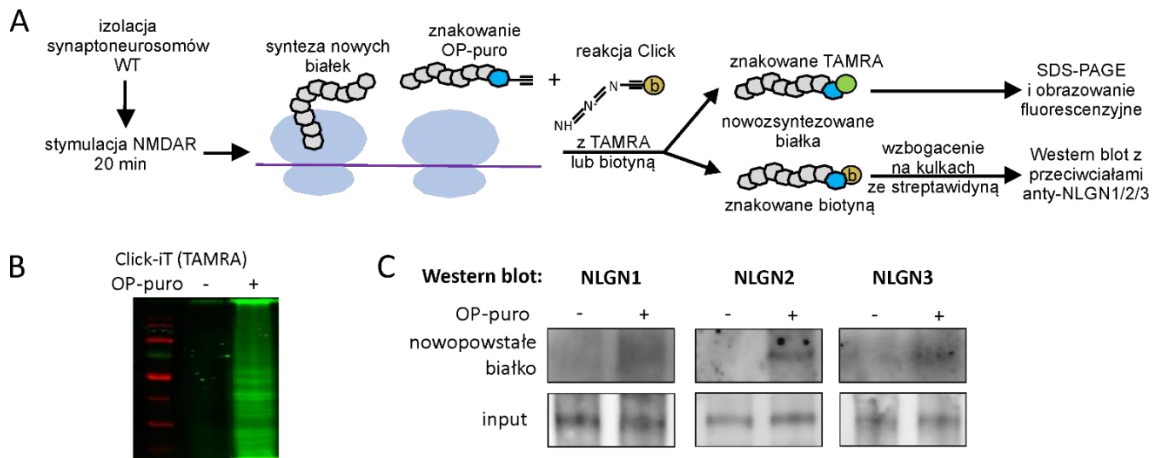
Rycina 54. Białko FMRP reguluje lokalną translację mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zależną od aktywności synaptycznej. **(A)** Schemat eksperymentu profilowania polirybosomów. Synaptoneurosome z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO w stanie podstawowym (stan podst) oraz stymulowane (stym NMDAR) zostały poddane lizie, wirowane w gradiencie gęstości sacharozy i zgodnie z profilem ich absorbancji podzielone na trzy frakcje: wolne kompleksy rybonukleoproteinowe i monosomy (Bailey et al.), lekkie polisomy (L-poli) i ciężkie polisomy (H-poli), które aktywnie przeprowadzają translację mRNA. Procent mRNA **(B)** *Gapdh* (negatywna kontrola), **(C)** *Nlgn1*, **(D)** *Nlgn2* i **(E)** *Nlgn3* obecnych w analizowanych frakcjach w stanie podstawowym i po stymulacji synaptycznej receptorów NMDA w synaptoneurosomach izolowanych z myszy WT i *Fmr1* KO zmierzony za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, $n=4$ eksperymenty, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ obliczone za pomocą one-way ANOVA (dla porównań w obrębie genotypu) oraz two-way ANOVA (dla porównań pomiędzy genotypami) z testem wielokrotnych porównań Sidaka; ns – brak różnic. Na podstawie (Chmielewska et al. 2019).

Żeby ocenić czy proces translacji neuroligin jest kontrolowany przez FMRP użyto metody frakcjonowania polirybosomów, która była wcześniej z powodzeniem wykorzystywana przez nasz zespół badawczy (Kuzniewska et al. 2018). Synaptoneurosome wyizolowane z mózgu myszy WT i *Fmr1* KO zostały poddane stymulacji receptorów NMDA w celu porównania dystrybucji mRNA neuroligin na polisomach w stanie podstawowym oraz po pobudzeniu neuronalnym. Eksperymenty

przeprowadzone we współpracy z dr Bożeną Kuźniewską i mgr Jackiem Miłkiem potwierdziły, że białko FMRP kontroluje lokalną synaptyczną translację mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3*. W przypadku myszy *Fmr1* KO, frakcja mRNA neuroligin związana z ciężkimi polisomami odwzorowuje stan po stymulacji u myszy o genotypie dzikim i nie zmienia się po stymulacji (Chmielewska et al. 2019). Ten wynik dowodzi, że u myszy *Fmr1* KO proces translacji jest zaburzony i prowadzi do zwiększonej syntezy białek neuroligin (Rycina 54). Uzyskane dane są zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których wykazano, że inne transkrypty zależne od białka FMRP zachowują się podobnie (Muddashetty et al. 2007; Janusz et al. 2013; Jones et al. 2018; Osterweil et al. 2010). Co istotne, powyższe wyniki zostały niedawno potwierdzone przez niezależny zespół badawczy, który za pomocą dopracowanej metody CLIP udowodnił, że sekwencja kodująca transkryptów wszystkich neuroligin *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* jest silnie wiązana przez białko FMRP w strukturze CA1 hipokampa (Sawicka et al. 2019).

Wiele transkryptów synaptycznych po transkrypcji w jądrze komórkowym neuronu nie ulega translacji w ciele komórki, lecz jest transportowane do wypustek dendrytycznych, gdzie ulega lokalnej syntezie w bezpośredniej bliskości synapsy w odpowiedzi na pobudzenie synaptyczne (Bramham and Wells 2007; Holt, Martin, and Schuman 2019; Hafner et al. 2019). W synapsie znajduje się kompletna maszyna translacyjna (Torre and Steward 1992; Kang and Schuman 1996), włączając rybosomy, tRNA oraz czynniki inicjacji i elongacji translacji (eIF2 i EF2) (Tiedge and Brosius 1996), co podkreśla znaczenie lokalnej translacji (Kim and Jung 2020). Doświadczenia przeprowadzone we współpracy z dr Bożeną Kuźniewską potwierdziły, że translacja mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zachodzi lokalnie w synapsie i jest zależna od aktywności synaptycznej (Rycina 55). Lokalna synteza białek neuroligin w synaptoneurosomach została zbadana za pomocą znakowania nowopowstałych białek analogiem puromycyny – OP-puro (ang. *O*-propargyl-puromycin), cykloaddycji biotyny w reakcji chemicznej ClickiT i detekcji NLGN1, NLGN2 i NLGN3 techniką Western blot (Rycina 55). Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami dla wielu innych ważnych synaptycznych białek, dla których potwierdzono lokalną translację w synapsie (Kim and Jung 2020; Hafner et al. 2019; Holt, Martin, and Schuman 2019; Liu-Yesucevitz et al. 2011; Cajigas et al. 2012). Proces lokalnej translacji w synapsie jest dla neuronów kluczowy by szybko, lokalnie i precyzyjnie odpowiedzieć na stymulację synaptyczną (Sutton and Schuman

2006) i stanowi jeden z głównych mechanizmów plastyczności synaptycznej (Biever, Donlin-Asp, and Schuman 2019).



Rycina 55. Indukowana aktywnością synaptyczną translacja mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* zachodzi lokalnie w synapsie. **(A)** Schemat wykrywania syntezy białek *de novo* w synaptoneurosomach przy użyciu znakowania alkinowym analogiem puromycyny (OP-puro) i reakcji chemicznej ClickiT. **(B)** Białka znakowane OP-puro wykrywane za pomocą reakcji ClickiT z azydkiem TAMRA i wizualizowane fluorescencyjnie w żelu poliakrylamidowym. **(C)** Detekcja białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 nowopowstałych lokalnie w synaptoneurosomach wyizolowanych z mózgu myszy o genotypie dzikim metodą Western blot. Białka znakowane OP-puro-biotyną wzbogacono na kulkach ze streptawidyną. Frakcja wejściowa (input) służyła jako kontrola eksperymentu. Na podstawie (Chmielewska et al. 2019).

5.5. Charakterystyka zależnej od aktywności dystrybucji neurologin w synapsie – wzmożone kierowanie białek NLGN1 i NLGN3 na błonę postsynaptyczną myszy *Fmr1* KO

Neurologiny są dostarczane na błonę postsynaptyczną przez transport pęcherzykowy, gdzie funkcjonują w postaci homo- lub heterodimerów (Poulopoulos et al. 2012). Żeby odróżnić i porównać poziom powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych form neurologin w synaptoneurosomach, przeprowadzono chemiczne sieciowanie białek powierzchniowych za pomocą odczynnika BS³. W wyniku tej procedury utrwalono białka, które ulegają ekspresji na błonie postsynaptycznej w bezpośredniej bliskości. Dzięki przeprowadzonej detekcji białek za pomocą metody Western blot uwidoczniono na jednym blacie zewnątrzkomórkowe dimery i wewnątrzkomórkowe monomery neurologin. W rezultacie odkryto podwyższony poziom

powierzchniowej NLGN1 i NLGN3 w synapsach myszy *Fmr1* KO w stanie podstawowym. Tę zależność zaobserwowano zarówno w synaptoneurosomach jak i pierwotnych hodowlach hipokampalnych. Uzyskany wynik sugeruje zwiększone kierowanie białek NLGN1 i NLGN3 do gęstości postsynaptycznej i błony synaps myszy *Fmr1* KO w porównaniu z myszami o genotypie dzikim. Ponadto, przeprowadzone komplementarne eksperymenty z użyciem metody biotynylacji białek powierzchniowych dodatkowo potwierdziły zwiększoną ekspresję białek NLGN1 i NLGN3 na powierzchni synapsy *Fmr1* KO.

Żeby zaobserwować zależne od aktywności neuronalnej zmiany w synaptycznej dystrybucji neuroligin synaptoneurosomy z myszy WT i *Fmr1* KO poddano analizie w czasie 2,5, 5, 10 i 20 minut po stymulacji receptorów NMDA. Ten eksperyment potwierdził sugerowane wcześniej przez innych autorów cięcie proteolityczne powierzchniowych NLGN1 indukowane w wyniku aktywności synaptycznej (Suzuki et al. 2012; Peixoto et al. 2012), co uwidoczniło w postaci prążka na wysokości około 95 kDa reprezentującego przecięty N-końcowy fragment NLGN1. Uchwyconemu procesowi proteolizy towarzyszył znaczny spadek poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN1, który wykrywalny był już w ciągu 2,5 minut po stymulacji receptorów NMDA. Co istotne, ta zależność była widoczna w przypadku obu genotypów myszy WT i *Fmr1* KO. Co ciekawe, tym samym czasie następował spadek poziomu wewnątrzkomórkowej NLGN1, również u obu genotypów myszy. Powyższa obserwacja występowała prawdopodobnie ze względu na uruchomienie lokalnej syntezy białka NLGN1, indukcję procesu kierowania wewnątrzkomórkowych form NLGN1 na powierzchnię synapsy oraz jej inkorporację do gęstości błony postsynaptycznej. Warto podkreślić, że nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w intensywności cięcia proteolitycznego NLGN1 pomiędzy synaptoneurosomami myszy WT i *Fmr1* KO, co sugeruje, że proces cięcia NLGN1 nie jest zaburzony w zespole łamliwego chromosomu X.

W eksperymentach przeprowadzonych dla NLGN3 wykazałam, że podstawowy poziom zewnątrzkomórkowej NLGN3 również jest podwyższony na synapsie myszy *Fmr1* KO w porównaniu do myszy WT. Tę zależność potwierdzono używając dwóch niezależnych metod – sieciowania i biotynylacji białek powierzchniowych w dwóch modelach badawczych – synaptoneurosomach i pierwotnych hodowlach hipokampalnych. W przypadku NLGN3 poziom wewnątrzkomórkowej NLGN3 w

synapsach myszy *Fmr1* KO również był podwyższony. Ponadto, analizując zależną od aktywności synaptycznej dystrybucję NLGN3 wykryłam, że poziom zewnątrzkomórkowej NLGN3 znacznie się zmniejsza już w ciągu 2,5 minut po stymulacji receptorów NMDA, w przypadku obu genotypów. Ta zbieżna z wynikiem dla NLGN1 obserwacja sugerowała cięcie proteolityczne NLGN3 pod wpływem stymulacji. Taki scenariusz wydawał się być prawdopodobny, tym bardziej, że NLGN3 występuje w błonie postsynaptycznej w postaci heterodimeru z NLGN1. Jednak za względu na brak dostępnego komercyjnie przeciwciała wykrywającego domenę zewnątrzkomórkową NLGN3 nie była możliwa wizualizacja N-końcowego produktu cięcia NLGN3. U myszy *Fmr1* KO zaobserwowano też znacznie szybsze odzyskiwanie wewnątrzkomórkowej puli NLGN3 do poziomu podstawowego, prawdopodobnie w wyniku uruchomienia lokalnej syntezy białka, co może wynikać ze zwiększonej translacji synaptycznej w synapsach *Fmr1* KO.

Charakterystyka przeprowadzona dla NLGN2 nie ujawniła różnic w poziomie zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej NLGN2 pomiędzy synapsami myszy WT i *Fmr1* KO w stanie podstawowym. Co istotne, podobnie jak dla NLGN1 i NLGN3 zaobserwowano spadek poziomu zewnątrzkomórkowej NLGN2 w ciągu 2,5 minuty po stymulacji neuronalnej, co może być wynikiem obróbki proteolitycznej NLGN2. Dodatkowo, analiza porównawcza zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji NLGN2 ujawniła szybsze odzyskiwanie wewnątrzkomórkowej puli NLGN2, prawdopodobnie w wyniku podwyższonej translacji tych białek w mózgu myszy *Fmr1* KO.

Podsumowując ten rozdział, przeprowadzone eksperymenty i uzyskane wyniki stanowią oryginalne opracowanie przedstawiające charakterystykę zależnego od aktywności neuronalnej rozmieszczenia białek neuroligin w synapsie. W wyniku przeprowadzonych badań zwizualizowano zmniejszenie poziomu powierzchniowych dimerów zawierających NLGN1, NLGN2 i NLGN3, ze względu na ich szybkie cięcie proteolityczne indukowane aktywnością synaptyczną. Jednocześnie w tym samym czasie następowało przywrócenie wewnątrzkomórkowej puli neuroligin, prawdopodobnie z powodu aktywacji ich translacji synaptycznej, po której lokalnie zsintetyzowane białka były kierowane z wnętrza synapsy do błony postsynaptycznej. Postuluję, że ten

dynamiczny proces jest niezbędny do utrzymania kluczowych funkcji synaps i umożliwienia plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych.

Podczas analizy Western blot okazało się, że prążki reprezentujące dimery neurologin są zlokalizowane na wysokości wskazującej masę molekularną poniżej 300 kDa. Skoro monomer neurologin ma masę 120 kDa, to oczekiwano prążka reprezentującego dimer na wysokości około 240 kDa. Wielce prawdopodobnym wyjaśnieniem uzyskanego wyniku jest fakt, że białka neurologin są glikozylowane, co znacznie zwiększa ich masę molekularną. W celu sprawdzenia tego aspektu przeprowadzono analizę wysokości prążków neurologin po traktowaniu enzymami usuwającymi reszty sacharydowe przyłączone do glikozylowanego białka. Wybrane deglikozylazy to Endo H (usuwająca reszty wysokomannozowe i hybrydowe N-glikany wewnątrz białka) i PNGaza F (usuwająca reszty cukrowe z asparaginy zlokalizowanej blisko C-końca białka) (Trimble and Tarentino 1991; Plummer, Phelan, and Tarentino 1987). Niemniej jednak okazało się, że masa molekularna usieciowanych dimerów neurologin w tym doświadczeniu wcale nie zbliżyła się do spodziewanej wartości około 240 kDa jaką powinien posiadać dimer neurologin. Obniżenie masy molekularnej białek nastąpiło tylko w przypadku monomerów neurologin. Skoro proces dimeryzacji uniemożliwia obniżenie masy molekularnej neurologin to otrzymany wynik może wskazywać, że miejsca glikozylacji neurologin znajdują się w domenie odpowiedzialnej za dimeryzację tych białek, przez co dostęp enzymów deglikolizujących jest niemożliwy. Kolejnym wyjaśnieniem dla uzyskanego wyniku może być niewłaściwy wybór zastosowanych deglikozylaz. Prawdopodobnie w celu zmniejszenia masy molekularnej dimerów neurologin należałoby inkubować synaptoneurosome z większą ilością innych enzymów usuwających reszty cukrowe. Co więcej, nie jest wykluczone, że neurologiny podlegają też jeszcze innym modyfikacjom postranslacyjnym, które wpływają na zwiększenie masy zewnątrzkomórkowych dimerów tych białek i nie były analizowane w niniejszym opracowaniu tego tematu. Ponadto, dimery neurologin analizowane w preparacie synaptoneurosomów (zawierającym część pre- i postsynaptyczną) mogły być połączone z neureksynami, co uniemożliwiło usunięcie reszt cukrowych od strony N-końca i domeny zewnątrzkomórkowej tych białek. Nie można też wykluczyć, że zaobserwowana znacznie wyższa masa molekularna dimerów neurologin wynikała

właśnie ze specyfiki tego doświadczenia i utrwalenia interakcji neuroligin z fragmentem ich presynaptycznych ligandów – neureksyn.

Charakterystyczną cechą neuroanatomiczną związaną z zespołem łamliwego chromosomu X jest zmieniona morfologia kolców dendrytycznych. Kolce dendrytyczne u ludzi oraz myszy *Fmr1* KO są wydłużone, cienkie i kształtem przypominają filopodia tak jak w przypadku niedojrzałych synaps (Bilousova et al. 2009; Purpura 1974). Od morfologii kolców dendrytycznych zależy charakter kontaktu na synapsach pobudzających. Postuluje się, że cieńsze kolce dendrytyczne charakterystyczne dla zespołu łamliwego chromosomu X zawierają mniej receptorów oraz białek w części postsynaptycznej (Bear, Huber, and Warren 2004). W prowadzonych badaniach nieoczekiwanie odkryłam, że synapsy myszy *Fmr1* KO zawierają więcej białek NLGN1 i NLGN3 w błonie postsynaptycznej niż synapsy myszy WT. Ta zależność została potwierdzona w dwóch modelach badawczych – synaptoneurosomach i pierwotnych hodowlach neuronalnych. Zaobserwowana zwiększona inkorporacja białek NLGN1 i NLGN3 do błony postsynaptycznej nie wynika ze zwiększonej liczby kolców dendrytycznych i synaps, ponieważ gęstość kolców dendrytycznych nie różni się pomiędzy mózgiem myszy WT i *Fmr1* KO (Bilousova et al. 2009; Pop et al. 2014; Cruz-Martin, Crespo, and Portera-Cailliau 2010). Uzyskane przeze mnie wyniki jednoznacznie wskazują, że podwyższony poziom neuroligin w synapsach myszy *Fmr1* KO wynika z braku regulacji ich translacji przez białko FMRP. Z otrzymanymi wynikami zgodne są niedawne doniesienia, że właściwy poziom NLGN1 na błonie postsynaptycznej jest kluczowy dla procesu dojrzewania kolców dendrytycznych (Moretto et al. 2019).

5.6. Analiza cięcia proteolitycznego neuroligin

Cięcie proteolityczne białek stanowi jeden z kluczowych procesów odpowiedzialnych za obróbkę, kierowanie do miejsca docelowego jak i regulację aktywności oraz poziomu ekspresji białek (Lee, Tsang, and Birch 2008). Białka adhezyjne na synapsie są poddawane obróbce proteolitycznej przez synaptyczne proteazy. Ten złożony i wciąż analizowany dla wielu białek proces zapewnia plastyczność synaptyczną przez możliwość modyfikacji kształtu kolców dendrytycznych (Conant, Allen, and Lim 2015).

W toku przeprowadzonych badań dowiodłam, że wszystkie izoformy białek neuroligin (NLGN1, NLGN2, NLGN3) podlegają cięciu proteolitycznemu w warunkach fizjologicznych. Ten aspekt zbadano dzięki zaprojektowaniu doświadczeń w sposób umożliwiający wykrycie krótkiego C-końcowego fragmentu, który zostaje w błonie postsynaptycznej po przecięciu białek neuroligin. To rozwiązanie zostało również zaproponowane ze względu na brak komercyjnie dostępnych przeciwciał rozpoznających domenę zewnątrzkomórkową NLGN2 i NLGN3, co uniemożliwiało detekcję dłuższego N-końcowego fragmentu potencjalnie powstającego w wyniku proteolizy tych białek. Istotny element nowości stanowi w tym przypadku nieopisane dotychczas cięcie NLGN2 i NLGN3 oraz wgląd w szczegóły molekularne tego procesu. Moje wyniki pokazują, że cięcie proteolityczne neuroligin jest zależne od pobudzenia neuronalnego i następuje w bardzo krótkim czasie – w ciągu 2,5 minut po indukcji aktywności synaptycznej *in vitro* (a nawet w ciągu 1 minuty; dane niepublikowane). Zainicjowany proces jest długotrwały, gdyż produkty cięcia tych białek są widoczne nawet po 20 minutach od indukcji aktywności synaptycznej. Uzyskane wyniki wskazują, że krótkotrwała aktywacja receptorów NMDA jest wystarczająca by zainicjować proces cięcia neuroligin w synaptoneurosomach. Zwłaszcza w kontekście dotychczas dostępnych doniesień raportujących obecność przeciętych fragmentów NLGN1 w pożywce z nad szczurzych neuronów korowych po 15 minutach inkubacji z glutaminianem lub NMDA (Suzuki et al. 2012).

Zgromadzone wyniki potwierdzają, że poziom neuroligin w błonie postsynaptycznej oraz proces ich cięcia jest ściśle związany z aktywacją synaptyczną receptorów, co ma następnie znaczenie funkcjonalne dla procesu przekazywania sygnału (Korshunova et al. 2015; Gjolund et al. 2017). Przykładowo, wykryto, że odcięty zewnątrzkomórkowy fragment NLGN1 oddziałuje z metabotropowym receptorem glutaminianu 2 (mGluR2) zlokalizowanym w błonie presynaptycznej hamując wydzielanie glutaminianu z pęcherzyków presynaptycznych i tym samym zmniejszając aktywność synaptyczną (Gjolund et al. 2017). Wiadomo też, że fragment NLGN1 oddziałuje z podjednostką NR1 receptora NMDA skutkując jego fosforylacją, co jest kluczowe dla procesu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego i zapamiętywania (Korshunova et al. 2015).

Co ważne, przeprowadzone doświadczenia umożliwiły wskazanie masy molekularnej powstających krótkich odciętych fragmentów. Dla poszczególnych izoform neurologin masa molekularna wynosi: NLGN1 około 26 kDa, NLGN2 około 20 kDa oraz NLGN3 około 26 kDa. Uzyskane niejednoznaczne wyniki proteolizy dla białka NLGN3 poddano konsultacji z profesorem Nils Brose, którego zespół badawczy skonstruował myszy *Nlgn3* KO. Dzięki zainicjowanej współpracy uzyskano myszy *Nlgn3* KO, których użycie umożliwiło poprawną weryfikację masy molekularnej odciętego krótkiego fragmentu NLGN3.

Co więcej, porównując warunki fizjologiczne ze stanem w zespole łamliwego chromosomu X wstępnie ustaliłam, że proces cięcia proteolitycznego wszystkich izoform neurologin występuje i nie jest znacząco odmienny w tej chorobie. Uzyskanie tych danych było kluczowe zwłaszcza ze względu na doniesienia o podwyższonej aktywności proteazy MMP-9 na synapsie w FXS (Janusz et al. 2013; Dziembowska et al. 2013). Moje obserwacje nie wykazały bardziej intensywnego procesu cięcia białek neurologin w synaptoneurosomach z myszy *Fmr1* KO, co może pośrednio świadczyć, że MMP-9 nie jest jedyną proteazą zaangażowaną w cięcie białek neurologin.

Na podstawie powyższych wyników podjęto próbę identyfikacji proteaz odpowiedzialnych za cięcie neurologin na synapsie. Warto podkreślić, że ten aspekt regulacji poziomu białek neurologin na synapsie nie został jeszcze szczegółowo zbadany. Dotychczasowe doniesienia sugerują udział proteazy MMP-9 (Peixoto et al. 2012) oraz ADAM10 (Suzuki et al. 2012; Prinzen et al. 2009) w obróbce enzymatycznej NLGN1. Niedawno przeprowadzone badania proteomiczne dodatkowo potwierdziły rolę enzymu ADAM10 w procesie cięcia NLGN1 (Kuhn et al. 2016). Po przecięciu, powstały dłuższy N-końcowy fragment NLGN1 jest wydzielany do przestrzeni synaptycznej. Dowiedziono, że w przypadku NLGN1 krótszy C-końcowy fragment zakotwiczony w błonie postsynaptycznej jest następnie cięty przez presenilinę/ γ -sekretazę (Suzuki et al. 2012). Postuluje się, że powstałe krótkie fragmenty NLGN1 wpływają na plastyczność synaptyczną i dynamikę przebudowy kolców dendrytycznych poprzez reorganizację aktyny związanej z białkami LIMK1/kofiliną (Liu et al. 2016). Co ciekawe, domena AChE, homologiczna do domeny zewnątrzkomórkowej neurologin również podlega cięciu proteolitycznemu, co ma znaczenie dla apoptozy komórek (Xie et al. 2011).

Proteoliza NLGN2 nie została jeszcze wyjaśniona, dlatego moje wyniki stanowią pionierskie opracowanie tego tematu. Z poprzednich doświadczeń wiadomo jedynie, że NLGN2 nie jest substratem proteazy ADAM10 (Suzuki et al. 2012; Prinzen et al. 2009), co wydaje się być logiczne w kontekście obecności enzymu ADAM10 na synapsach glutamatergicznych (Marcello et al. 2007), podczas gdy NLGN2 występuje na synapsach GABAergicznym (Graf et al. 2004). Inni autorzy, którzy analizowali zmiany po aktywacji ścieżki sygnałowej kinazy białkowej C zakomunikowali brak produktów cięcia NLGN2 w pożywce z nad komórek HEK293 transfekowanych konstruktem NLGN2 (Bemben et al. 2019). Zaś w modelu *Drosophila melanogaster* wykazano, że zanim NLGN2 zostanie skierowana na błonę postsynaptyczną podlega obróbce proteolitycznej w systemie pęcherzyków, jednak autorzy pracy nie wskazali proteaz uczestniczących w tym procesie (Tu et al. 2017).

W czasie trwania niniejszych badań pojawiły się pierwsze doniesienia na temat cięcia NLGN3 (Venkatesh et al. 2015). Co niezwykle ważne, udowodniono, że przecięty fragment NLGN3 wydzielany w wyniku aktywności neuronalnej przyczynia się do wzrostu nowotworów mózgu – glejaków, co odbywa się poprzez ścieżkę PI3K–mTOR (Venkatesh et al. 2015). Autorzy dotychczas przeprowadzonych analiz proteaz uczestniczących w tym procesie wstępnie zasugerowali udział metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej jak np. MMP-9/13 (Venkatesh et al. 2017) oraz proteazy ADAM10 (Venkatesh et al. 2017). Niezależne badania proteomiczne również wskazały na rolę enzymu ADAM10 w cięciu NLGN3 (Kuhn et al. 2016). Niedawno opublikowane wyniki z użyciem czterech komercyjnie dostępnych inhibitorów pośrednio sugerują, że w cięciu NLGN3 nie bierze udziału proteaza MMP-2, ale może uczestniczyć MMP-3 i MMP-9 (Bemben et al. 2019). W tych badaniach autorzy analizowali proces cięcia NLGN3 indukowany przez ścieżkę sygnałową kinazy białkowej C oraz odkryli, że ten proces jest specyficzny wyłącznie dla izoformy NLGN3 i powoduje znaczący spadek siły synapsy. Dodatkowo zasugerowano, że może następować cięcie NLGN3 w stanie podstawowym, w którym pośredniczy enzym ADAM10 (Bemben et al. 2019). Z kolei badania sekretomu komórek nerwowych wykazały obecność przeciętych fragmentów NLGN1, NLGN2 i NLGN3, których ilość była regulowana przez β -sekretazę BACE1 (Kuhn et al. 2012). BACE1 jest proteazą aspartylową będącą kluczowym celem leków w chorobie Alzheimera, gdyż pośredniczy w uwalnianiu białka prekursorowego amyloidu (APP) i

katalizuje pierwszy etap w tworzeniu patogennego peptydu A β (Vassar et al. 2009). Zaś w modelu *Drosophila melanogaster* wykazano obróbkę proteolityczną NLGN3 do dojrzałej formy, co stanowi odmienny mechanizm do konwencjonalnego cięcia NLGN zakotwiczonych w błonie postsynaptycznej. Udowodniono, że ten proces następuje w aparacie Golgiego i jest niezbędny do poprawnej aktywności lokomotorycznej muszki owocowej (Wu et al. 2018). Pokazano, że w tym niezależnym od aktywności synaptycznej procesie uczestniczy proteaza TACE (enzym konwertujący czynnik martwicy nowotworu TNF α), która generuje powstanie dłuższego N-końcowego fragmentu i krótkiego C-końcowego błonowego fragmentu.

W celu dokładniejszego zbadania tej tematyki i ustalenia udziału proteazy MMP-9 w procesie cięcia neuroligin przeprowadzono badania z komercyjnie dostępnymi inhibitorami. Za względu na fakt, iż badania są obecnie kontynuowane nie wszystkie wyniki zawarte w niniejszej pracy doktorskiej są przedstawione w wersji końcowej. Stężenia inhibitorów zostały dobrane na podstawie danych literaturowych. W czasie 2,5 minuty po stymulacji receptora NMDA zaobserwowano zmniejszenie proteolizy NLGN3 przy użyciu zarówno inhibitora metaloproteinaz o szerokim spektrum działania GM6001 jak również specyficznego inhibitora MMP-9/13i. Przy użyciu inhibitora MMP-9/13i w stężeniu 5 μ M następowało całkowite zahamowanie procesu cięcia wszystkich izoform neuroligin, co niejednoznacznie wskazywało na rolę proteazy MMP-9 i/lub MMP-13 w tym procesie.

Żeby ocenić udział proteazy MMP-13 w procesie zależnego od pobudzenia neuronalnego cięcia neuroligin uzyskano myszy pozbawione ekspresji oraz aktywności proteazy MMP-9 (Vu et al. 1998). Fakt, że w stymulowanych synaptoneurosomach myszy *Mmp-9* KO zaobserwowano obecność prążków reprezentujących krótkie C-końcowe fragmenty stanowi niezbitą dowód, że w proces cięcia wszystkich neuroligin, w tym NLGN2 i NLGN3 jest zaangażowana również inna proteaza niż MMP-9. Co więcej, uzyskany z trzech niezależnych eksperymentów wynik całkowitego zahamowania cięcia i braku prążka o masie 26 kDa po inkubacji z inhibitorem MMP-9/13i w synaptoneurosomach z myszy *Mmp-9* KO jednoznacznie wskazuje na znaczący udział proteazy MMP-13 u obróbce proteolitycznej białka NLGN3. Enzym MMP-13 może pełnić tę rolę bezpośrednio lub pośrednio, gdyż wiadomo, że MMP-13 reguluje aktywność innych proteaz, np. sekretazy BACE1, MT1-MMP, MMP-2 czy MMP-9,

poprzez odcięcie domeny proenzymu oraz ich aktywację (Leeman, Curran, and Murray 2002). Z kolei aktywność MMP-13 jest zależna od aktywacji przez MMP3 i MMP-2. Ponadto, kolagenaza MMP-13 jest znana z przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, funkcji w mineralizacji kości i nowotworzenia (Young, Barter, and Wilkinson 2019), a od niedawna postuluje się jej rolę w rozwoju choroby Alzheimera (Paumier and Thinakaran 2019; Young, Barter, and Wilkinson 2019) oraz zapaleniu kości i stawów (Li, Wang, Yuan, et al. 2017).

Prezentowane studium proteaz uczestniczących w cięciu białek neuroligin wymaga kontynuacji i dokładniejszej weryfikacji udziału innych proteaz (Fields 2019). Poza enzymami z grupy metaloproteinaz gruntowną analizę warto też przeprowadzić dla proteaz z grupy ADAM, co nie zostało ujęte w tym opracowaniu. Istnieją doniesienia sugerujące udział proteazy ADAM-10 w cięciu NLGN1 i NLGN3 (Kuhn et al. 2016; Bembien et al. 2019), zatem naturalną kontynuacją wydaje się być potwierdzenie lub wykluczenie roli tego enzymu w cięciu NLGN2. Co więcej, na podstawie konfrontacji uzyskanych wyników z danymi literaturowymi zakładam scenariusz, że w procesie cięcia poszczególnych izoform neuroligin uczestniczy więcej niż jeden enzym proteolityczny. Dość prawdopodobna jest też możliwość, że udział poszczególnych synaptycznych proteaz zależy od rodzaju stymulacji i aktywacji ścieżki sygnałowej, która doprowadziła do tego procesu.

Reasumując, potranslacyjne cięcie białek jest kluczowym procesem dla funkcji wielu białek, w tym neuroligin. Dalsza identyfikacja proteaz i mechanizmów odpowiedzialnych za proces cięcia na różnych typach synaps jest kluczowa by uzyskać informacje na temat kontroli proteolitycznej neuroligin, jak również innych synaptycznych białek adhezyjnych.

Podsumowując, wyniki zgromadzone w niniejszej pracy doktorskiej dostarczają dowodów, że poziom ekspresji neuroligin na synapsie jest zależny od dwóch aspektów: kontroli etapu translacji mRNA neuroligin przez białko FMRP oraz regulacji przez proces cięcia proteolitycznego białek neuroligin. Powyższe wyniki poszerzają wiedzę na temat funkcji synapsy w warunkach fizjologicznych na poziomie molekularnym. Ponadto, prezentują mechanizm, za pomocą którego brak białka FMRP może przyczynić się do nieprawidłowego poziomu białek związanych z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Co

więcej, uzyskane dane mogą wskazać ścieżki do opracowania nowych strategii terapeutycznych w przyszłości.

6. Wnioski

1. Poziom białek NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w mózgu myszy *Fmr1* KO podczas gdy nie ma różnic w poziomie mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w synaptoneurosomach myszy WT i *Fmr1* KO co sugeruje, że białko FMRP reguluje lokalną syntezę białek NLGN1, NLGN2 i NLGN3 w synapsie.
2. Białko FMRP współwystępuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w neuronach.
3. Białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2*, *Nlgn3* w synaptoneurosomach izolowanych z mózgu myszy o genotypie dzikim.
4. Podstawowy poziom białek NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w błonie postsynaptycznej myszy *Fmr1* KO i poziom wszystkich neurologin obniża się po pobudzeniu neuronalnym w obu genotypach.
5. Białka NLGN1, NLGN2 i NLGN3 ulegają zależnemu od aktywności synaptycznej cięciu proteolitycznemu na synapsie.
6. Proces cięcia białek neurologin na synapsie występuje w warunkach fizjologicznych, ale również w mózgu myszy pozbawionych ekspresji genu *Fmr1* i *Mmp-9*.

7. Piśmiennictwo

- Abrahams, B. S., D. E. Arking, D. B. Campbell, H. C. Mefford, E. M. Morrow, L. A. Weiss, I. Menashe, T. Wadkins, S. Banerjee-Basu, and A. Packer. 2013. 'SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs)', *Mol Autism*, 4: 36.
- Adams, J. B., T. Audhya, E. Geis, E. Gehn, V. Fimbres, E. L. Pollard, J. Mitchell, J. Ingram, R. Hellmers, D. Laake, J. S. Matthews, K. Li, J. C. Naviaux, R. K. Naviaux, R. L. Adams, D. M. Coleman, and D. W. Quig. 2018. 'Comprehensive Nutritional and Dietary Intervention for Autism Spectrum Disorder-A Randomized, Controlled 12-Month Trial', *Nutrients*, 10.
- Adinolfi, S., A. Ramos, S. R. Martin, F. Dal Piaz, P. Pucci, B. Bardoni, J. L. Mandel, and A. Pastore. 2003. 'The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding', *Biochemistry*, 42: 10437-44.
- Anderson, G. 2019. 'Autism Spectrum Disorder: Pathophysiology and Treatment Implications', *Curr Pharm Des*, 25: 4319-20.
- Arac, D., A. A. Boucard, E. Ozkan, P. Strop, E. Newell, T. C. Sudhof, and A. T. Brunger. 2007. 'Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions', *Neuron*, 56: 992-1003.
- Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura, and P. G. Haydon. 1999. 'Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission', *Can J Physiol Pharmacol*, 77: 699-706.
- Ascano, M., Jr., N. Mukherjee, P. Bandaru, J. B. Miller, J. D. Nusbaum, D. L. Corcoran, C. Langlois, M. Munschauer, S. Dewell, M. Hafner, Z. Williams, U. Ohler, and T. Tuschl. 2012. 'FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression', *Nature*, 492: 382-6.
- Asiminas, A., A. D. Jackson, S. R. Louros, S. M. Till, T. Spano, O. Dando, M. F. Bear, S. Chattarji, G. E. Hardingham, E. K. Osterweil, D. J. A. Wyllie, E. R. Wood, and P. C. Kind. 2019. 'Sustained correction of associative learning deficits after brief, early treatment in a rat model of Fragile X Syndrome', *Sci Transl Med*, 11.
- Auerbach, B. D., E. K. Osterweil, and M. F. Bear. 2011. 'Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology', *Nature*, 480: 63-8.
- Azarfar, A., N. Calcini, C. Huang, F. Zeldenrust, and T. Celikel. 2018. 'Neural coding: A single neuron's perspective', *Neurosci Biobehav Rev*, 94: 238-47.
- Bagni, C., and B. A. Oostra. 2013. 'Fragile X syndrome: From protein function to therapy', *Am J Med Genet A*, 161A: 2809-21.
- Bagni, C., F. Tassone, G. Neri, and R. Hagerman. 2012. 'Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics', *J Clin Invest*, 122: 4314-22.
- Bailey, A., A. Le Couteur, I. Gottesman, P. Bolton, E. Simonoff, E. Yuzda, and M. Rutter. 1995. 'Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study', *Psychol Med*, 25: 63-77.
- Bailey, A., W. Phillips, and M. Rutter. 1996. 'Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives', *J Child Psychol Psychiatry*, 37: 89-126.
- Banerjee-Basu, S., and A. Packer. 2010. 'SFARI Gene: an evolving database for the autism research community', *Dis Model Mech*, 3: 133-5.
- Banerjee, A., M. F. Ifrim, A. N. Valdez, N. Raj, and G. J. Bassell. 2018. 'Aberrant RNA translation in fragile X syndrome: From FMRP mechanisms to emerging therapeutic strategies', *Brain Res*, 1693: 24-36.
- Baribeau, D. A., S. Vigod, E. Pullenayegum, C. M. Kerns, P. Mirenda, I. M. Smith, T. Vaillancourt, J. Volden, C. Waddell, L. Zwaigenbaum, T. Bennett, E. Duku, M. Elsabbagh, S. Georgiades,

- W. J. Ungar, A. Zaidman Zait, and P. Szatmari. 2020. 'Co-occurring trajectories of anxiety and insistence on sameness behaviour in autism spectrum disorder', *Br J Psychiatry*: 1-8.
- Baskin, J. H., M. Sperber, and B. H. Price. 2006. 'Asperger syndrome revisited', *Rev Neurol Dis*, 3: 1-7.
- Bassell, G. J., and S. T. Warren. 2008. 'Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function', *Neuron*, 60: 201-14.
- Batish, M., P. van den Bogaard, F. R. Kramer, and S. Tyagi. 2012. 'Neuronal mRNAs travel singly into dendrites', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 4645-50.
- Baudouin, S., and P. Scheiffele. 2010. 'SnapShot: Neuroligin-neurexin complexes', *Cell*, 141: 908, 08 e1.
- Bear, M. F., K. M. Huber, and S. T. Warren. 2004. 'The mGluR theory of fragile X mental retardation', *Trends Neurosci*, 27: 370-7.
- Bemben, M. A., Q. A. Nguyen, T. Wang, Y. Li, R. A. Nicoll, and K. W. Roche. 2015. 'Autism-associated mutation inhibits protein kinase C-mediated neuroligin-4X enhancement of excitatory synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2551-6.
- Bemben, M. A., T. A. Nguyen, Y. Li, T. Wang, R. A. Nicoll, and K. W. Roche. 2019. 'Isoform-specific cleavage of neuroligin-3 reduces synapse strength', *Mol Psychiatry*, 24: 145-60.
- Bemben, M. A., S. L. Shipman, T. Hirai, B. E. Herring, Y. Li, J. D. Badger, 2nd, R. A. Nicoll, J. S. Diamond, and K. W. Roche. 2014. 'CaMKII phosphorylation of neuroligin-1 regulates excitatory synapses', *Nat Neurosci*, 17: 56-64.
- Bemben, M. A., S. L. Shipman, R. A. Nicoll, and K. W. Roche. 2015. 'The cellular and molecular landscape of neuroligins', *Trends Neurosci*, 38: 496-505.
- Bernier, R., C. Golzio, B. Xiong, H. A. Stessman, B. P. Coe, O. Penn, K. Witherspoon, J. Gerds, C. Baker, A. T. Vulto-van Silfhout, J. H. Schuurs-Hoeijmakers, M. Fichera, P. Bosco, S. Buono, A. Alberti, P. Failla, H. Peeters, J. Steyaert, Lelm Vissers, L. Francescato, H. C. Mefford, J. A. Rosenfeld, T. Bakken, B. J. O'Roak, M. Pawlus, R. Moon, J. Shendure, D. G. Amaral, E. Lein, J. Rankin, C. Romano, B. B. A. de Vries, N. Katsanis, and E. E. Eichler. 2014. 'Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development', *Cell*, 158: 263-76.
- Berry-Kravis, E. M., L. Lindemann, A. E. Jonch, G. Apostol, M. F. Bear, R. L. Carpenter, J. N. Crawley, A. Curie, V. Des Portes, F. Hossain, F. Gasparini, B. Gomez-Mancilla, D. Hessler, E. Loth, S. H. Scharf, P. P. Wang, F. Von Raison, R. Hagerman, W. Spooren, and S. Jacquemont. 2018. 'Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome', *Nat Rev Drug Discov*, 17: 280-99.
- Berryer, M. H., F. F. Hamdan, L. L. Klitten, R. S. Moller, L. Carmant, J. Schwartzentruber, L. Patry, S. Dobrzyniecka, D. Rochefort, M. Neugnot-Ceroli, J. C. Lacaillle, Z. Niu, C. M. Eng, Y. Yang, S. Palardy, C. Belhumeur, G. A. Rouleau, N. Tommerup, L. Immken, M. H. Beauchamp, G. S. Patel, J. Majewski, M. A. Tarnopolsky, K. Scheffzek, H. Hjalgrim, J. L. Michaud, and G. Di Cristo. 2013. 'Mutations in SYNGAP1 cause intellectual disability, autism, and a specific form of epilepsy by inducing haploinsufficiency', *Hum Mutat*, 34: 385-94.
- Bey, A. L., and Y. H. Jiang. 2014. 'Overview of mouse models of autism spectrum disorders', *Curr Protoc Pharmacol*, 66: 5 66 1-26.
- Bhakar, A. L., G. Dolen, and M. F. Bear. 2012. 'The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses)', *Annu Rev Neurosci*, 35: 417-43.
- Biederer, T., and T. C. Sudhof. 2000. 'Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18', *J Biol Chem*, 275: 39803-6.
- Biever, A., P. G. Donlin-Asp, and E. M. Schuman. 2019. 'Local translation in neuronal processes', *Curr Opin Neurobiol*, 57: 141-48.

- Bilousova, T. V., L. Dansie, M. Ngo, J. Aye, J. R. Charles, D. W. Ethell, and I. M. Ethell. 2009. 'Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model', *J Med Genet*, 46: 94-102.
- Blundell, J., C. A. Blaiss, M. R. Etherton, F. Espinosa, K. Tabuchi, C. Walz, M. F. Bolliger, T. C. Sudhof, and C. M. Powell. 2010. 'Neuroigin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior', *J Neurosci*, 30: 2115-29.
- Bodian, D. 1965. 'A Suggestive Relationship of Nerve Cell Rna with Specific Synaptic Sites', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53: 418-25.
- Bolliger, M. F., J. Pei, S. Maxeiner, A. A. Boucard, N. V. Grishin, and T. C. Sudhof. 2008. 'Unusually rapid evolution of Neuroigin-4 in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 6421-6.
- Boudreau, A. C., M. Milovanovic, K. L. Conrad, C. Nelson, C. R. Ferrario, and M. E. Wolf. 2012. 'A protein cross-linking assay for measuring cell surface expression of glutamate receptor subunits in the rodent brain after in vivo treatments', *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 5: Unit 5 30 1-19.
- Bourgeron, T. 2016. 'Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research', *C R Biol*, 339: 300-7.
- Bramham, C. R., and D. G. Wells. 2007. 'Dendritic mRNA: transport, translation and function', *Nat Rev Neurosci*, 8: 776-89.
- Brown, V., P. Jin, S. Ceman, J. C. Darnell, W. T. O'Donnell, S. A. Tenenbaum, X. Jin, Y. Feng, K. D. Wilkinson, J. D. Keene, R. B. Darnell, and S. T. Warren. 2001. 'Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome', *Cell*, 107: 477-87.
- Budreck, E. C., O. B. Kwon, J. H. Jung, S. Baudouin, A. Thommen, H. S. Kim, Y. Fukazawa, H. Harada, K. Tabuchi, R. Shigemoto, P. Scheiffele, and J. H. Kim. 2013. 'Neuroigin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 725-30.
- Budreck, E. C., and P. Scheiffele. 2007. 'Neuroigin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses', *Eur J Neurosci*, 26: 1738-48.
- Cajigas, I. J., G. Tushev, T. J. Will, S. tom Dieck, N. Fuerst, and E. M. Schuman. 2012. 'The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging', *Neuron*, 74: 453-66.
- Cao, X., and K. Tabuchi. 2016. 'Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroigins and neurodevelopmental disorders', *Neurosci Res*.
- . 2017. 'Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroigins and neurodevelopmental disorders', *Neurosci Res*, 116: 3-9.
- Cellot, G., and E. Cherubini. 2014. 'Reduced inhibitory gate in the barrel cortex of Neuroigin3R451C knock-in mice, an animal model of autism spectrum disorders', *Physiol Rep*, 2.
- Chahrouh, M., S. Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S. T. Wong, J. Qin, and H. Y. Zoghbi. 2008. 'MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription', *Science*, 320: 1224-9.
- Chamma, I., M. Letellier, C. Butler, B. Tessier, K. H. Lim, I. Gauthereau, D. Choquet, J. B. Sibarita, S. Park, M. Sainlos, and O. Thoumine. 2016. 'Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin', *Nat Commun*, 7: 10773.
- Chanda, S., J. Aoto, S. J. Lee, M. Wernig, and T. C. Sudhof. 2016. 'Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroigin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking', *Mol Psychiatry*, 21: 169-77.

- Chanda, S., W. D. Hale, B. Zhang, M. Wernig, and T. C. Sudhof. 2017. 'Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse Properties', *J Neurosci*, 37: 6816-36.
- Chanda, S., S. Marro, M. Wernig, and T. C. Sudhof. 2013. 'Neurons generated by direct conversion of fibroblasts reproduce synaptic phenotype caused by autism-associated neuroligin-3 mutation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 16622-7.
- Chen, E., and S. Joseph. 2015. 'Fragile X mental retardation protein: A paradigm for translational control by RNA-binding proteins', *Biochimie*, 114: 147-54.
- Chen, F., V. Venugopal, B. Murray, and G. Rudenko. 2011. 'The structure of neurexin 1alpha reveals features promoting a role as synaptic organizer', *Structure*, 19: 779-89.
- Chen, J. L., K. L. Villa, J. W. Cha, P. T. So, Y. Kubota, and E. Nedivi. 2012. 'Clustered dynamics of inhibitory synapses and dendritic spines in the adult neocortex', *Neuron*, 74: 361-73.
- Chen, X., H. Liu, A. H. Shim, P. J. Focia, and X. He. 2008. 'Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions', *Nat Struct Mol Biol*, 15: 50-6.
- Chih, B., S. K. Afridi, L. Clark, and P. Scheiffele. 2004. 'Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins', *Hum Mol Genet*, 13: 1471-7.
- Chih, B., L. Gollan, and P. Scheiffele. 2006. 'Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex', *Neuron*, 51: 171-8.
- Chmielewska, J. J., B. Kuzniewska, J. Milek, K. Urbanska, and M. Dziembowska. 2019. 'Neuroligin 1, 2, and 3 Regulation at the Synapse: FMRP-Dependent Translation and Activity-Induced Proteolytic Cleavage', *Mol Neurobiol*, 56: 2741-59.
- Choquet, D., and A. Triller. 2013. 'The dynamic synapse', *Neuron*, 80: 691-703.
- Christensen, D. L., M. J. Maenner, D. Bilder, J. N. Constantino, J. Daniels, M. S. Durkin, R. T. Fitzgerald, M. Kurzius-Spencer, S. D. Pettygrove, C. Robinson, J. Shenouda, T. White, W. Zahorodny, K. Pazol, and P. Dietz. 2019. 'Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years - Early Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, Seven Sites, United States, 2010, 2012, and 2014', *MMWR Surveill Summ*, 68: 1-19.
- Christie, S. B., M. R. Akins, J. E. Schwob, and J. R. Fallon. 2009. 'The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits', *J Neurosci*, 29: 1514-24.
- Chubykin, A. A., D. Atasoy, M. R. Etherton, N. Brose, E. T. Kavalali, J. R. Gibson, and T. C. Sudhof. 2007. 'Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2', *Neuron*, 54: 919-31.
- Comery, T. A., J. B. Harris, P. J. Willems, B. A. Oostra, S. A. Irwin, I. J. Weiler, and W. T. Greenough. 1997. 'Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 5401-4.
- Comoletti, D., A. De Jaco, L. L. Jennings, R. E. Flynn, G. Gaietta, I. Tsigelny, M. H. Ellisman, and P. Taylor. 2004. 'The Arg451Cys-neuroligin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing', *J Neurosci*, 24: 4889-93.
- Comoletti, D., R. Flynn, L. L. Jennings, A. Chubykin, T. Matsumura, H. Hasegawa, T. C. Sudhof, and P. Taylor. 2003. 'Characterization of the interaction of a recombinant soluble neuroligin-1 with neurexin-1beta', *J Biol Chem*, 278: 50497-505.
- Conant, K., M. Allen, and S. T. Lim. 2015. 'Activity dependent CAM cleavage and neurotransmission', *Front Cell Neurosci*, 9: 305.
- Connor, S. A., I. Ammendrup-Johnsen, A. W. Chan, Y. Kishimoto, C. Murayama, N. Kurihara, A. Tada, Y. Ge, H. Lu, R. Yan, J. M. LeDue, H. Matsumoto, H. Kiyonari, Y. Kirino, F. Matsuzaki, T. Suzuki, T. H. Murphy, Y. T. Wang, T. Yamamoto, and A. M. Craig. 2016. 'Altered Cortical Dynamics and Cognitive Function upon Haploinsufficiency of the Autism-Linked Excitatory Synaptic Suppressor MDGA2', *Neuron*, 91: 1052-68.

- Corbin, F., M. Bouillon, A. Fortin, S. Morin, F. Rousseau, and E. W. Khandjian. 1997. 'The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes', *Hum Mol Genet*, 6: 1465-72.
- Cortesi, F., F. Giannotti, A. Ivanenko, and K. Johnson. 2010. 'Sleep in children with autistic spectrum disorder', *Sleep Med*, 11: 659-64.
- Craig, A. M., and Y. Kang. 2007. 'Neurexin-neuroigin signaling in synapse development', *Curr Opin Neurobiol*, 17: 43-52.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, Consortium. 2013. 'Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis', *Lancet*, 381: 1371-79.
- Cruz-Martin, A., M. Crespo, and C. Portera-Cailliau. 2010. 'Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice', *J Neurosci*, 30: 7793-803.
- D'Hulst, C., and R. F. Kooy. 2009. 'Fragile X syndrome: from molecular genetics to therapy', *J Med Genet*, 46: 577-84.
- Dahlhaus, R., and A. El-Husseini. 2010. 'Altered neuroigin expression is involved in social deficits in a mouse model of the fragile X syndrome', *Behav Brain Res*, 208: 96-105.
- Dahlhaus, R., R. M. Hines, B. D. Eadie, T. S. Kannangara, D. J. Hines, C. E. Brown, B. R. Christie, and A. El-Husseini. 2010. 'Overexpression of the cell adhesion protein neuroigin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus', *Hippocampus*, 20: 305-22.
- Dansie, L. E., and I. M. Ethell. 2011. 'Casting a net on dendritic spines: the extracellular matrix and its receptors', *Dev Neurobiol*, 71: 956-81.
- Dansie, L. E., K. Phommahaxay, A. G. Okusanya, J. Uwadia, M. Huang, S. E. Rotschafer, K. A. Razak, D. W. Ethell, and I. M. Ethell. 2013. 'Long-lasting effects of minocycline on behavior in young but not adult Fragile X mice', *Neuroscience*, 246: 186-98.
- Darnell, J. C., K. B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S. T. Warren, and R. B. Darnell. 2001. 'Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function', *Cell*, 107: 489-99.
- Darnell, J. C., and E. Klann. 2013. 'The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS', *Nat Neurosci*, 16: 1530-6.
- Darnell, J. C., O. Mostovetsky, and R. B. Darnell. 2005. 'FMRP RNA targets: identification and validation', *Genes Brain Behav*, 4: 341-9.
- Darnell, J. C., S. J. Van Driesche, C. Zhang, K. Y. Hung, A. Mele, C. E. Fraser, E. F. Stone, C. Chen, J. J. Fak, S. W. Chi, D. D. Licatalosi, J. D. Richter, and R. B. Darnell. 2011. 'FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism', *Cell*, 146: 247-61.
- Darnell, J. C., S. T. Warren, and R. B. Darnell. 2004. 'The fragile X mental retardation protein, FMRP, recognizes G-quartets', *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 10: 49-52.
- Darnell, R. B. 2010. 'HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1: 266-86.
- De Boulle, K., A. J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van den Bos, E. de Graaff, B. A. Oostra, and P. J. Willems. 1993. 'A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation', *Nat Genet*, 3: 31-5.
- De Jaco, A., D. Comoletti, Z. Kovarik, G. Gaietta, Z. Radic, O. Lockridge, M. H. Ellisman, and P. Taylor. 2006. 'A mutation linked with autism reveals a common mechanism of endoplasmic reticulum retention for the alpha,beta-hydrolase fold protein family', *J Biol Chem*, 281: 9667-76.
- Dean, C., and T. Dresbach. 2006. 'Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function', *Trends Neurosci*, 29: 21-9.

- DeFilippis, M., and K. D. Wagner. 2016. 'Treatment of Autism Spectrum Disorder in Children and Adolescents', *Psychopharmacol Bull*, 46: 18-41.
- Denman, R. B. 2003. 'Deja vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs', *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 1-7.
- Devys, D., Y. Lutz, N. Rouyer, J. P. Bellocq, and J. L. Mandel. 1993. 'The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation', *Nat Genet*, 4: 335-40.
- Ding, Q., F. Sethna, and H. Wang. 2014. 'Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background', *Behav Brain Res*, 271: 72-8.
- Dissanayake, C., Q. Bui, D. Bulhak-Paterson, R. Huggins, and D. Z. Loesch. 2009. 'Behavioural and cognitive phenotypes in idiopathic autism versus autism associated with fragile X syndrome', *J Child Psychol Psychiatry*, 50: 290-9.
- Dorrbaum, A. R., B. Alvarez-Castelao, B. Nassim-Assir, J. D. Langer, and E. M. Schuman. 2020. 'Proteome dynamics during homeostatic scaling in cultured neurons', *Elife*, 9.
- Doyle, M., and M. A. Kiebler. 2011. 'Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging', *EMBO J*, 30: 3540-52.
- Drozd, M., B. Bardoni, and M. Capovilla. 2018. 'Modeling Fragile X Syndrome in Drosophila', *Front Mol Neurosci*, 11: 124.
- Dudanova, I., K. Tabuchi, A. Rohlmann, T. C. Sudhof, and M. Missler. 2007. 'Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation', *J Comp Neurol*, 502: 261-74.
- Dundas, C. M., D. Demonte, and S. Park. 2013. 'Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications', *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 9343-53.
- Dziembowska, M., J. Milek, A. Janusz, E. Rejmak, E. Romanowska, T. Gorkiewicz, A. Tiron, C. R. Bramham, and L. Kaczmarek. 2012. 'Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9', *J Neurosci*, 32: 14538-47.
- Dziembowska, M., D. I. Pretto, A. Janusz, L. Kaczmarek, M. J. Leigh, N. Gabriel, B. Durbin-Johnson, R. J. Hagerman, and F. Tassone. 2013. 'High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline', *Am J Med Genet A*, 161A: 1897-903.
- Eberhart, D. E., H. E. Malter, Y. Feng, and S. T. Warren. 1996. 'The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals', *Hum Mol Genet*, 5: 1083-91.
- Ebert, D. H., and M. E. Greenberg. 2013. 'Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder', *Nature*, 493: 327-37.
- Elvira, G., S. Wasiak, V. Blandford, X. K. Tong, A. Serrano, X. Fan, M. del Rayo Sanchez-Carbente, F. Servant, A. W. Bell, D. Boismenu, J. C. Lacaille, P. S. McPherson, L. DesGroseillers, and W. S. Sossin. 2006. 'Characterization of an RNA granule from developing brain', *Mol Cell Proteomics*, 5: 635-51.
- Espinosa, F., Z. Xuan, S. Liu, and C. M. Powell. 2015. 'Neuroigin 1 modulates striatal glutamatergic neurotransmission in a pathway and NMDAR subunit-specific manner', *Front Synaptic Neurosci*, 7: 11.
- Esposito, D., A. Belli, R. Ferri, and O. Bruni. 2020. 'Sleeping without Prescription: Management of Sleep Disorders in Children with Autism with Non-Pharmacological Interventions and Over-the-Counter Treatments', *Brain Sci*, 10.
- Etherton, M., C. Foldy, M. Sharma, K. Tabuchi, X. Liu, M. Shamloo, R. C. Malenka, and T. C. Sudhof. 2011. 'Autism-linked neuroigin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 13764-9.

- Etherton, M. R., C. A. Blaiss, C. M. Powell, and T. C. Sudhof. 2009. 'Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 17998-8003.
- Etherton, M. R., K. Tabuchi, M. Sharma, J. Ko, and T. C. Sudhof. 2011. 'An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus', *EMBO J*, 30: 2908-19.
- Faulkner, R. L., T. J. Wishard, C. K. Thompson, H. H. Liu, and H. T. Cline. 2015. 'FMRP regulates neurogenesis in vivo in *Xenopus laevis* tadpoles', *eNeuro*, 2: e0055.
- Feng, Y., D. Absher, D. E. Eberhart, V. Brown, H. E. Malter, and S. T. Warren. 1997. 'FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association', *Mol Cell*, 1: 109-18.
- Feng, Y., C. A. Gutekunst, D. E. Eberhart, H. Yi, S. T. Warren, and S. M. Hersch. 1997. 'Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes', *J Neurosci*, 17: 1539-47.
- Fields, G. B. 2019. 'The Rebirth of Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Moving Beyond the Dogma', *Cells*, 8.
- 'Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium'. 1994. *Cell*, 78: 23-33.
- Foldy, C., R. C. Malenka, and T. C. Sudhof. 2013. 'Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling', *Neuron*, 78: 498-509.
- Gabus, C., R. Mazroui, S. Tremblay, E. W. Khandjian, and J. L. Darlix. 2004. 'The fragile X mental retardation protein has nucleic acid chaperone properties', *Nucleic Acids Res*, 32: 2129-37.
- Gambetti, P., L. A. Autilio-Gambetti, N. K. Gonatas, and B. Shafer. 1972. 'Protein synthesis in synaptosomal fractions. Ultrastructural radioautographic study', *J Cell Biol*, 52: 526-35.
- Garcia-Arocena, D., and P. J. Hagerman. 2010. 'Advances in understanding the molecular basis of FXTAS', *Hum Mol Genet*, 19: R83-9.
- Giannone, G., M. Mondin, D. Grillo-Bosch, B. Tessier, E. Saint-Michel, K. Czondor, M. Sainlos, D. Choquet, and O. Thoumine. 2013. 'Neurexin-1beta binding to neuroligin-1 triggers the preferential recruitment of PSD-95 versus gephyrin through tyrosine phosphorylation of neuroligin-1', *Cell Rep*, 3: 1996-2007.
- Gjorlund, M. D., E. M. M. Carlsen, A. B. Konig, O. Dmytrieva, A. V. Petersen, J. Jacobsen, V. Berezin, J. F. Perrier, and S. Owczarek. 2017. 'Soluble Ectodomain of Neuroligin 1 Decreases Synaptic Activity by Activating Metabotropic Glutamate Receptor 2', *Front Mol Neurosci*, 10: 116.
- Gkogkas, C. G., A. Khoutorsky, I. Ran, E. Rampakakis, T. Nevarko, D. B. Weatherill, C. Vasuta, S. Yee, M. Truitt, P. Dallaire, F. Major, P. Lasko, D. Ruggero, K. Nader, J. C. Lacaille, and N. Sonenberg. 2013. 'Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control', *Nature*, 493: 371-7.
- Goodlin-Jones, B. L., F. Tassone, L. W. Gane, and R. J. Hagerman. 2004. 'Autistic spectrum disorder and the fragile X premutation', *J Dev Behav Pediatr*, 25: 392-8.
- Graf, E. R., X. Zhang, S. X. Jin, M. W. Linhoff, and A. M. Craig. 2004. 'Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins', *Cell*, 119: 1013-26.
- Grossman, A. W., N. M. Elisseou, B. C. McKinney, and W. T. Greenough. 2006. 'Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines', *Brain Res*, 1084: 158-64.
- Grove, J., S. Ripke, T. D. Als, M. Mattheisen, R. K. Walters, H. Won, J. Pallesen, E. Agerbo, O. A. Andreassen, R. Anney, S. Awashti, R. Belliveau, F. Bettella, J. D. Buxbaum, J. Bybjerg-Grauholm, M. Baekvad-Hansen, F. Cerrato, K. Chambert, J. H. Christensen, C.

- Churchhouse, K. Dellenvall, D. Demontis, S. De Rubeis, B. Devlin, S. Djurovic, A. L. Dumont, J. I. Goldstein, C. S. Hansen, M. E. Hauberg, M. V. Hollegaard, S. Hope, D. P. Howrigan, H. Huang, C. M. Hultman, L. Klei, J. Maller, J. Martin, A. R. Martin, J. L. Moran, M. Nyegaard, T. Naerland, D. S. Palmer, A. Palotie, C. B. Pedersen, M. G. Pedersen, T. dPoterba, J. B. Poulsen, B. S. Pourcain, P. Qvist, K. Rehnstrom, A. Reichenberg, J. Reichert, E. B. Robinson, K. Roeder, P. Roussos, E. Saemundsen, S. Sandin, F. K. Satterstrom, G. Davey Smith, H. Stefansson, S. Steinberg, C. R. Stevens, P. F. Sullivan, P. Turley, G. B. Walters, X. Xu, Consortium Autism Spectrum Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics, Bupgen, Consortium Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics, Team andMe Research, K. Stefansson, D. H. Geschwind, M. Nordentoft, D. M. Hougaard, T. Werge, O. Mors, P. B. Mortensen, B. M. Neale, M. J. Daly, and A. D. Borglum. 2019. 'Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder', *Nat Genet*, 51: 431-44.
- Gulyas, A. I., M. Megias, Z. Emri, and T. F. Freund. 1999. 'Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus', *J Neurosci*, 19: 10082-97.
- Gulyassy, P., G. Puska, B. A. Gyorffy, K. Todorov-Volgyi, G. Juhasz, L. Drahos, and K. A. Kekesi. 2020. 'Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures', *Amino Acids*.
- Haas, K. T., B. Compans, M. Letellier, T. M. Bartol, D. Grillo-Bosch, T. J. Sejnowski, M. Sainlos, D. Choquet, O. Thoumine, and E. Hosy. 2018. 'Pre-post synaptic alignment through neuroligin-1 tunes synaptic transmission efficiency', *Elife*, 7.
- Hafner, A. S., P. G. Donlin-Asp, B. Leitch, E. Herzog, and E. M. Schuman. 2019. 'Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments', *Science*, 364.
- Hagerman, R., J. Lauterborn, J. Au, and E. Berry-Kravis. 2012. 'Fragile X syndrome and targeted treatment trials', *Results Probl Cell Differ*, 54: 297-335.
- Hamilton, S. M., J. R. Green, S. Veeraragavan, L. Yuva, A. McCoy, Y. Wu, J. Warren, L. Little, D. Ji, X. Cui, E. Weinstein, and R. Paylor. 2014. 'Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders', *Behav Neurosci*, 128: 103-9.
- Hammer, M., D. Krueger-Burg, L. P. Tuffy, B. H. Cooper, H. Taschenberger, S. P. Goswami, H. Ehrenreich, P. Jonas, F. Varoqueaux, J. S. Rhee, and N. Brose. 2015. 'Perturbed Hippocampal Synaptic Inhibition and gamma-Oscillations in a Neuroligin-4 Knockout Mouse Model of Autism', *Cell Rep*, 13: 516-23.
- Harris, S. W., D. Hessler, B. Goodlin-Jones, J. Ferranti, S. Bacalman, I. Barbato, F. Tassone, P. J. Hagerman, H. Herman, and R. J. Hagerman. 2008. 'Autism profiles of males with fragile X syndrome', *Am J Ment Retard*, 113: 427-38.
- Harrison, C. J., E. M. Jack, T. D. Allen, and R. Harris. 1983. 'The fragile X: a scanning electron microscope study', *J Med Genet*, 20: 280-5.
- Hasan, U., and S. K. Singh. 2019. 'The Astrocyte-Neuron Interface: An Overview on Molecular and Cellular Dynamics Controlling Formation and Maintenance of the Tripartite Synapse', *Methods Mol Biol*, 1938: 3-18.
- Hata, Y., S. Butz, and T. C. Sudhof. 1996. 'CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligin', *J Neurosci*, 16: 2488-94.
- Hata, Y., B. Davletov, A. G. Petrenko, R. Jahn, and T. C. Sudhof. 1993. 'Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neuroligin', *Neuron*, 10: 307-15.
- Heine, M., O. Thoumine, M. Mondin, B. Tessier, G. Giannone, and D. Choquet. 2008. 'Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neuroligin/neuroligin contacts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 20947-52.

- Hering, H., and M. Sheng. 2001. 'Dendritic spines: structure, dynamics and regulation', *Nat Rev Neurosci*, 2: 880-8.
- Hernandez, R. N., R. L. Feinberg, R. Vaurio, N. M. Passanante, R. E. Thompson, and W. E. Kaufmann. 2009. 'Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: a longitudinal evaluation', *Am J Med Genet A*, 149A: 1125-37.
- Hollingsworth, E. B., E. T. McNeal, J. L. Burton, R. J. Williams, J. W. Daly, and C. R. Creveling. 1985. 'Biochemical characterization of a filtered synaptoneurosome preparation from guinea pig cerebral cortex: cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-generating systems, receptors, and enzymes', *J Neurosci*, 5: 2240-53.
- Holt, C. E., K. C. Martin, and E. M. Schuman. 2019. 'Local translation in neurons: visualization and function', *Nat Struct Mol Biol*, 26: 557-66.
- Hoon, M., V. Krishnamoorthy, T. Gollisch, B. Falkenburger, and F. Varoqueaux. 2017. 'Loss of Neuroligin3 specifically downregulates retinal GABA α 2 receptors without abolishing direction selectivity', *PLoS One*, 12: e0181011.
- Hoon, M., T. Soykan, B. Falkenburger, M. Hammer, A. Patrizi, K. F. Schmidt, M. Sassoe-Pognetto, S. Lowel, T. Moser, H. Taschenberger, N. Brose, and F. Varoqueaux. 2011. 'Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 3053-8.
- Hooshmandi, M., C. Wong, and A. Khoutorsky. 2020. 'Dysregulation of translational control signaling in autism spectrum disorders', *Cell Signal*, 75: 109746.
- Huguet, G., E. Ey, and T. Bourgeron. 2013. 'The genetic landscapes of autism spectrum disorders', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14: 191-213.
- Ichtchenko, K., Y. Hata, T. Nguyen, B. Ullrich, M. Missler, C. Moomaw, and T. C. Sudhof. 1995. 'Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins', *Cell*, 81: 435-43.
- Ichtchenko, K., T. Nguyen, and T. C. Sudhof. 1996. 'Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins', *J Biol Chem*, 271: 2676-82.
- Jacquemont, S., E. Berry-Kravis, R. Hagerman, F. von Raison, F. Gasparini, G. Apostol, M. Ufer, V. Des Portes, and B. Gomez-Mancilla. 2014. 'The challenges of clinical trials in fragile X syndrome', *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 1237-50.
- Jamain, S., H. Quach, C. Betancur, M. Rastam, C. Colineaux, I. C. Gillberg, H. Soderstrom, B. Giros, M. Leboyer, C. Gillberg, T. Bourgeron, and Study Paris Autism Research International Sibpair. 2003. 'Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism', *Nat Genet*, 34: 27-9.
- Jang, S., H. Lee, and E. Kim. 2017. 'Synaptic adhesion molecules and excitatory synaptic transmission', *Curr Opin Neurobiol*, 45: 45-50.
- Janusz, A., J. Milek, M. Perycz, L. Pacini, C. Bagni, L. Kaczmarek, and M. Dziembowska. 2013. 'The Fragile X mental retardation protein regulates matrix metalloproteinase 9 mRNA at synapses', *J Neurosci*, 33: 18234-41.
- Jasinska, M., J. Milek, I. A. Cymerman, S. Leski, L. Kaczmarek, and M. Dziembowska. 2016. 'miR-132 Regulates Dendritic Spine Structure by Direct Targeting of Matrix Metalloproteinase 9 mRNA', *Mol Neurobiol*, 53: 4701-12.
- Jedlicka, P., M. Vnencak, D. D. Krueger, T. Jungenitz, N. Brose, and S. W. Schwarzacher. 2015. 'Neuroligin-1 regulates excitatory synaptic transmission, LTP and EPSP-spike coupling in the dentate gyrus in vivo', *Brain Struct Funct*, 220: 47-58.
- Jeong, J., S. Pandey, Y. Li, J. D. Badger, 2nd, W. Lu, and K. W. Roche. 2019. 'PSD-95 binding dynamically regulates NLGN1 trafficking and function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 12035-44.
- Jeong, J., J. D. Paskus, and K. W. Roche. 2017. 'Posttranslational modifications of neuroligins regulate neuronal and glial signaling', *Curr Opin Neurobiol*, 45: 130-38.

- Jiang, M., J. Polepalli, L. Y. Chen, B. Zhang, T. C. Sudhof, and R. C. Malenka. 2017. 'Conditional ablation of neuroligin-1 in CA1 pyramidal neurons blocks LTP by a cell-autonomous NMDA receptor-independent mechanism', *Mol Psychiatry*, 22: 375-83.
- Johnson, C. P., S. M. Myers, and Disabilities American Academy of Pediatrics Council on Children With. 2007. 'Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders', *Pediatrics*, 120: 1183-215.
- Jones, A. R., C. C. Overly, and S. M. Sunkin. 2009. 'The Allen Brain Atlas: 5 years and beyond', *Nat Rev Neurosci*, 10: 821-8.
- Jones, K. J., S. Templet, K. Zemoura, B. Kuzniewska, F. X. Pena, H. Hwang, D. J. Lei, H. Haensgen, S. Nguyen, C. Saenz, M. Lewis, M. Dziembowska, and W. Xu. 2018. 'Rapid, experience-dependent translation of neurogranin enables memory encoding', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E5805-E14.
- Jung, H., C. G. Gkogkas, N. Sonenberg, and C. E. Holt. 2014. 'Remote control of gene function by local translation', *Cell*, 157: 26-40.
- Jung, S. Y., J. Kim, O. B. Kwon, J. H. Jung, K. An, A. Y. Jeong, C. J. Lee, Y. B. Choi, C. H. Bailey, E. R. Kandel, and J. H. Kim. 2010. 'Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 4710-5.
- Kang, H., and E. M. Schuman. 1996. 'A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity', *Science*, 273: 1402-6.
- Kanner, L. 1968. 'Autistic disturbances of affective contact', *Acta Paedopsychiatr*, 35: 100-36.
- Kazdoba, T. M., P. T. Leach, J. L. Silverman, and J. N. Crawley. 2014. 'Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse', *Intractable Rare Dis Res*, 3: 118-33.
- Kelleher, R. J., 3rd, and M. F. Bear. 2008. 'The autistic neuron: troubled translation?', *Cell*, 135: 401-6.
- Keller, F., and A. M. Persico. 2003. 'The neurobiological context of autism', *Mol Neurobiol*, 28: 1-22.
- Khandjian, E. W., M. E. Huot, S. Tremblay, L. Davidovic, R. Mazroui, and B. Bardoni. 2004. 'Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13357-62.
- Khoutorsky, A., R. P. Bonin, R. E. Sorge, C. G. Gkogkas, S. A. Pawlowski, S. M. Jafarnejad, M. H. Pitcher, T. Alain, J. Perez-Sanchez, E. W. Salter, L. Martin, A. Ribeiro-da-Silva, Y. De Koninck, F. Cervero, J. S. Mogil, and N. Sonenberg. 2015. 'Translational control of nociception via 4E-binding protein 1', *Elife*, 4.
- Kiebler, M. A., and G. J. Bassell. 2006. 'Neuronal RNA granules: movers and makers', *Neuron*, 51: 685-90.
- Kikin, O., L. D'Antonio, and P. S. Bagga. 2006. 'QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences', *Nucleic Acids Res*, 34: W676-82.
- Kim, E., and H. Jung. 2020. 'Local mRNA translation in long-term maintenance of axon health and function', *Curr Opin Neurobiol*, 63: 15-22.
- Klann, E., and T. E. Dever. 2004. 'Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity', *Nat Rev Neurosci*, 5: 931-42.
- Korshunova, I., M. D. Gjorlund, S. Owczarek, A. V. Petersen, J. F. Perrier, C. R. Gotzsche, and V. Berezin. 2015. 'A neuroligin-1-derived peptide stimulates phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit and rescues MK-801-induced decrease in long-term potentiation and memory impairment', *Pharmacol Res Perspect*, 3: e00126.
- Krueger, D. D., E. K. Osterweil, S. P. Chen, L. D. Tye, and M. F. Bear. 2011. 'Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 2587-92.

- Krueger, D. D., L. P. Tuffy, T. Papadopoulos, and N. Brose. 2012. 'The role of neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses', *Curr Opin Neurobiol*, 22: 412-22.
- Kruth, K. A., T. M. Grisolano, C. A. Ahern, and A. J. Williams. 2020. 'SCN2A channelopathies in the autism spectrum of neuropsychiatric disorders: a role for pluripotent stem cells?', *Mol Autism*, 11: 23.
- Kuhn, P. H., A. V. Colombo, B. Schusser, D. Drey Mueller, S. Wetzel, U. Schepers, J. Herber, A. Ludwig, E. Kremmer, D. Montag, U. Muller, M. Schweizer, P. Saftig, S. Brase, and S. F. Lichtenthaler. 2016. 'Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease ADAM10 in axon targeting and synapse function', *Elife*, 5.
- Kuhn, P. H., K. Koroniak, S. Hogg, A. Colombo, U. Zeitschel, M. Willem, C. Volbracht, U. Schepers, A. Imhof, A. Hoffmeister, C. Haass, S. Rossner, S. Brase, and S. F. Lichtenthaler. 2012. 'Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons', *EMBO J*, 31: 3157-68.
- Kuzniewska, B., M. Chojnacka, J. Milek, and M. Dziembowska. 2018. 'Preparation of polysomal fractions from mouse brain synaptoneuroosomes and analysis of polysomal-bound mRNAs', *J Neurosci Methods*, 293: 226-33.
- Kuzniewska, B., D. Cysewski, M. Wasilewski, P. Sakowska, J. Milek, T. M. Kulinski, M. Winiarski, P. Kozielwicz, E. Knapska, M. Dadlez, A. Chacinska, A. Dziembowski, and M. Dziembowska. 2020. 'Mitochondrial protein biogenesis in the synapse is supported by local translation', *EMBO Rep*: e48882.
- Kwon, H. B., Y. Kozorovitskiy, W. J. Oh, R. T. Peixoto, N. Akhtar, J. L. Saulnier, C. Gu, and B. L. Sabatini. 2012. 'Neuroigin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number', *Nat Neurosci*, 15: 1667-74.
- Laumonnier, F., F. Bonnet-Brihault, M. Gomot, R. Blanc, A. David, M. P. Moizard, M. Raynaud, N. Ronce, E. Lemonnier, P. Calvas, B. Laudier, J. Chelly, J. P. Fryns, H. H. Ropers, B. C. Hamel, C. Andres, C. Barthelemy, C. Moraine, and S. Briault. 2004. 'X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family', *Am J Hum Genet*, 74: 552-7.
- Lee, T. W., V. W. Tsang, and N. P. Birch. 2008. 'Synaptic plasticity-associated proteases and protease inhibitors in the brain linked to the processing of extracellular matrix and cell adhesion molecules', *Neuron Glia Biol*, 4: 223-34.
- Leeman, M. F., S. Curran, and G. I. Murray. 2002. 'The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 37: 149-66.
- Leung, C., and Z. Jia. 2016. 'Mouse Genetic Models of Human Brain Disorders', *Front Genet*, 7: 40.
- Li, H., D. Wang, Y. Yuan, and J. Min. 2017. 'New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis', *Arthritis Res Ther*, 19: 248.
- Li, J., L. Wang, H. Guo, L. Shi, K. Zhang, M. Tang, S. Hu, S. Dong, Y. Liu, T. Wang, P. Yu, X. He, Z. Hu, J. Zhao, C. Liu, Z. S. Sun, and K. Xia. 2017. 'Targeted sequencing and functional analysis reveal brain-size-related genes and their networks in autism spectrum disorders', *Mol Psychiatry*, 22: 1282-90.
- Liao, L., S. K. Park, T. Xu, P. Vanderklish, and J. R. Yates, 3rd. 2008. 'Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15281-6.
- Licatalosi, D. D., A. Mele, J. J. Fak, J. Ule, M. Kayikci, S. W. Chi, T. A. Clark, A. C. Schweitzer, J. E. Blume, X. Wang, J. C. Darnell, and R. B. Darnell. 2008. 'HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing', *Nature*, 456: 464-9.

- Liu-Yesucevitz, L., G. J. Bassell, A. D. Gitler, A. C. Hart, E. Klann, J. D. Richter, S. T. Warren, and B. Wolozin. 2011. 'Local RNA translation at the synapse and in disease', *J Neurosci*, 31: 16086-93.
- Liu, A., Z. Zhou, R. Dang, Y. Zhu, J. Qi, G. He, C. Leung, D. Pak, Z. Jia, and W. Xie. 2016. 'Neuroigin 1 regulates spines and synaptic plasticity via LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization', *J Cell Biol*, 212: 449-63.
- Liu, J. J., K. P. Grace, R. L. Horner, M. A. Cortez, Y. Shao, and Z. Jia. 2017. 'Neuroigin 3 R451C mutation alters electroencephalography spectral activity in an animal model of autism spectrum disorders', *Mol Brain*, 10: 10.
- Loomes, R., L. Hull, and W. P. L. Mandy. 2017. 'What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 56: 466-74.
- Louros, S. R., and E. K. Osterweil. 2016. 'Perturbed proteostasis in autism spectrum disorders', *J Neurochem*, 139: 1081-92.
- Mackowiak, M., P. Mordalska, and K. Wedzony. 2014. 'Neuroligins, synapse balance and neuropsychiatric disorders', *Pharmacol Rep*, 66: 830-5.
- Malenka, R. C., and M. F. Bear. 2004. 'LTP and LTD: an embarrassment of riches', *Neuron*, 44: 5-21.
- Marcello, E., F. Gardoni, D. Mauceri, S. Romorini, A. Jeromin, R. Epis, B. Borroni, F. Cattabeni, C. Sala, A. Padovani, and M. Di Luca. 2007. 'Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity', *J Neurosci*, 27: 1682-91.
- Marro, S. G., S. Chanda, N. Yang, J. A. Janas, G. Valperga, J. Trotter, B. Zhou, S. Merrill, I. Yousif, H. Shelby, H. Vogel, M. Y. S. Kalani, T. C. Sudhof, and M. Wernig. 2019. 'Neuroigin-4 Regulates Excitatory Synaptic Transmission in Human Neurons', *Neuron*, 103: 617-26 e6.
- Martin, J. P., and J. Bell. 1943. 'A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage', *J Neurol Psychiatry*, 6: 154-7.
- Masi, A., M. M. DeMayo, N. Glozier, and A. J. Guastella. 2017. 'An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options', *Neurosci Bull*, 33: 183-93.
- McNaughton, C. H., J. Moon, M. S. Strawderman, K. N. Maclean, J. Evans, and B. J. Strupp. 2008. 'Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome', *Behav Neurosci*, 122: 293-300.
- Megias, M., Z. Emri, T. F. Freund, and A. I. Gulyas. 2001. 'Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells', *Neuroscience*, 102: 527-40.
- Missler, M., R. Fernandez-Chacon, and T. C. Sudhof. 1998. 'The making of neurexins', *J Neurochem*, 71: 1339-47.
- Missler, M., and T. C. Sudhof. 1998. 'Neurexins: three genes and 1001 products', *Trends Genet*, 14: 20-6.
- Missler, M., W. Zhang, A. Rohlmann, G. Kattenstroth, R. E. Hammer, K. Gottmann, and T. C. Sudhof. 2003. 'Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis', *Nature*, 423: 939-48.
- Modi, B., D. Pimpinella, A. Pazienti, P. Zacchi, E. Cherubini, and M. Griguoli. 2019. 'Possible Implication of the CA2 Hippocampal Circuit in Social Cognition Deficits Observed in the Neuroigin 3 Knock-Out Mouse, a Non-Syndromic Animal Model of Autism', *Front Psychiatry*, 10: 513.
- Moller, H. J. 2018. 'Possibilities and limitations of DSM-5 in improving the classification and diagnosis of mental disorders', *Psychiatr Pol*, 52: 611-28.
- Mondin, M., V. Labrousse, E. Hosy, M. Heine, B. Tessier, F. Levet, C. Poujol, C. Blanchet, D. Choquet, and O. Thoumine. 2011. 'Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds', *J Neurosci*, 31: 13500-15.

- Moretto, E., A. Longatti, L. Murru, I. Chamma, A. Sessa, J. Zapata, E. Hosy, M. Sainlos, J. Saint-Pol, E. Rubinstein, D. Choquet, V. Broccoli, G. Schiavo, O. Thoumine, and M. Passafaro. 2019. 'TSPAN5 Enriched Microdomains Provide a Platform for Dendritic Spine Maturation through Neuroligin-1 Clustering', *Cell Rep*, 29: 1130-46 e8.
- Muddashetty, R. S., S. Kelic, C. Gross, M. Xu, and G. J. Bassell. 2007. 'Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome', *J Neurosci*, 27: 5338-48.
- Muhle, R., S. V. Trentacoste, and I. Rapin. 2004. 'The genetics of autism', *Pediatrics*, 113: e472-86.
- Nam, C. I., and L. Chen. 2005. 'Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 6137-42.
- Nelson, S. B., and V. Valakh. 2015. 'Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders', *Neuron*, 87: 684-98.
- Nguyen, Q. A., M. E. Horn, and R. A. Nicoll. 2016. 'Distinct roles for extracellular and intracellular domains in neuroligin function at inhibitory synapses', *Elife*, 5.
- Norris, R. H. C., L. Churilov, A. J. Hannan, and J. Nithianantharajah. 2019. 'Mutations in neuroligin-3 in male mice impact behavioral flexibility but not relational memory in a touchscreen test of visual transitive inference', *Mol Autism*, 10: 42.
- O'Roak, B. J., L. Vives, W. Fu, J. D. Egerton, I. B. Stanaway, I. G. Phelps, G. Carvill, A. Kumar, C. Lee, K. Ankenman, J. Munson, J. B. Hiatt, E. H. Turner, R. Levy, D. R. O'Day, N. Krumm, B. P. Coe, B. K. Martin, E. Borenstein, D. A. Nickerson, H. C. Mefford, D. Doherty, J. M. Akey, R. Bernier, E. E. Eichler, and J. Shendure. 2012. 'Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders', *Science*, 338: 1619-22.
- Osterweil, E. K., D. D. Krueger, K. Reinhold, and M. F. Bear. 2010. 'Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome', *J Neurosci*, 30: 15616-27.
- Pajareya, K., and K. Nopmaneejumruslers. 2011. 'A pilot randomized controlled trial of DIR/Floortime parent training intervention for pre-school children with autistic spectrum disorders', *Autism*, 15: 563-77.
- Paumier, J. M., and G. Thinakaran. 2019. 'Matrix metalloproteinase 13, a new target for therapy in Alzheimer's disease', *Genes Dis*, 6: 1-2.
- Peixoto, R. T., P. A. Kunz, H. Kwon, A. M. Mabb, B. L. Sabatini, B. D. Philpot, and M. D. Ehlers. 2012. 'Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1', *Neuron*, 76: 396-409.
- Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque. 2009. 'Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information', *Trends Neurosci*, 32: 421-31.
- Pettem, K. L., D. Yokomaku, H. Takahashi, Y. Ge, and A. M. Craig. 2013. 'Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development', *J Cell Biol*, 200: 321-36.
- Pieretti, M., F. P. Zhang, Y. H. Fu, S. T. Warren, B. A. Oostra, C. T. Caskey, and D. L. Nelson. 1991. 'Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome', *Cell*, 66: 817-22.
- Pirozzi, F., B. Nelson, and G. Mirzaa. 2018. 'From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size', *Dialogues Clin Neurosci*, 20: 267-82.
- Plummer, T. H., Jr., A. W. Phelan, and A. L. Tarentino. 1987. 'Detection and quantification of peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidases', *Eur J Biochem*, 163: 167-73.
- Polsek, D., T. Jagatic, M. Cepanec, P. R. Hof, and G. Simic. 2011. 'Recent Developments in Neuropathology of Autism Spectrum Disorders', *Transl Neurosci*, 2: 256-64.

- Pop, A. S., J. Levenega, C. E. de Esch, R. A. Buijsen, I. M. Nieuwenhuizen, T. Li, A. Isaacs, F. Gasparini, B. A. Oostra, and R. Willemsen. 2014. 'Rescue of dendritic spine phenotype in Fmr1 KO mice with the mGluR5 antagonist AFQ056/Mavoglurant', *Psychopharmacology (Berl)*, 231: 1227-35.
- Poulopoulos, A., G. Aramuni, G. Meyer, T. Soykan, M. Hoon, T. Papadopoulos, M. Zhang, I. Paarmann, C. Fuchs, K. Harvey, P. Jedlicka, S. W. Schwarzacher, H. Betz, R. J. Harvey, N. Brose, W. Zhang, and F. Varoqueaux. 2009. 'Neuroigin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin', *Neuron*, 63: 628-42.
- Poulopoulos, A., T. Soykan, L. P. Tuffy, M. Hammer, F. Varoqueaux, and N. Brose. 2012. 'Homodimerization and isoform-specific heterodimerization of neuroligins', *Biochem J*, 446: 321-30.
- Prinzen, C., D. Trumbach, W. Wurst, K. Endres, R. Postina, and F. Fahrenholz. 2009. 'Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice', *BMC Genomics*, 10: 66.
- Purpura, D. P. 1974. 'Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation', *Science*, 186: 1126-8.
- Raman, M., W. Chen, and M. H. Cobb. 2007. 'Differential regulation and properties of MAPKs', *Oncogene*, 26: 3100-12.
- Ramocki, M. B., and H. Y. Zoghbi. 2008. 'Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes', *Nature*, 455: 912-8.
- Ramos, A., D. Hollingworth, and A. Pastore. 2003. 'G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA', *RNA*, 9: 1198-207.
- Rein, A., L. E. Henderson, and J. G. Levin. 1998. 'Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication', *Trends Biochem Sci*, 23: 297-301.
- Reissner, C., M. Klose, R. Fairless, and M. Missler. 2008. 'Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15124-9.
- RK, C. Yuen, D. Merico, M. Bookman, L. Howe J, B. Thiruvahindrapuram, R. V. Patel, J. Whitney, N. Deflaux, J. Bingham, Z. Wang, G. Pellecchia, J. A. Buchanan, S. Walker, C. R. Marshall, M. Uddin, M. Zarrei, E. Deneault, L. D'Abate, A. J. Chan, S. Koyanagi, T. Paton, S. L. Pereira, N. Hoang, W. Engchuan, E. J. Higginbotham, K. Ho, S. Lamoureux, W. Li, J. R. MacDonald, T. Nalpathamkalam, W. W. Sung, F. J. Tsoi, J. Wei, L. Xu, A. M. Tasse, E. Kirby, W. Van Etten, S. Twigger, W. Roberts, I. Drmic, S. Jilderda, B. M. Modi, B. Kellam, M. Szego, C. Cytrynbaum, R. Weksberg, L. Zwaigenbaum, M. Woodbury-Smith, J. Brian, L. Senman, A. Iaboni, K. Doyle-Thomas, A. Thompson, C. Chrysler, J. Leef, T. Savion-Lemieux, I. M. Smith, X. Liu, R. Nicolson, V. Seifer, A. Fedele, E. H. Cook, S. Dager, A. Estes, L. Gallagher, B. A. Malow, J. R. Parr, S. J. Spence, J. Vorstman, B. J. Frey, J. T. Robinson, L. J. Strug, B. A. Fernandez, M. Elsabbagh, M. T. Carter, J. Hallmayer, B. M. Knoppers, E. Anagnostou, P. Szatmari, R. H. Ring, D. Glazer, M. T. Pletcher, and S. W. Scherer. 2017. 'Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder', *Nat Neurosci*, 20: 602-11.
- Ruby, K., K. Falvey, and R. J. Kulesza. 2015. 'Abnormal neuronal morphology and neurochemistry in the auditory brainstem of Fmr1 knockout rats', *Neuroscience*, 303: 285-98.
- Rudenko, G. 2017. 'Dynamic Control of Synaptic Adhesion and Organizing Molecules in Synaptic Plasticity', *Neural Plast*, 2017: 6526151.
- Sabaratnam, M., P. G. Vroegop, and S. K. Gangadharan. 2001. 'Epilepsy and EEG findings in 18 males with fragile X syndrome', *Seizure*, 10: 60-3.

- Sakers, K., and C. Eroglu. 2019. 'Control of neural development and function by glial neuroligins', *Curr Opin Neurobiol*, 57: 163-70.
- Salcedo-Arellano, M. J., R. J. Hagerman, and V. Martinez-Cerdeno. 2020. 'Fragile X syndrome: clinical presentation, pathology and treatment', *Gac Med Mex*, 156: 60-66.
- Saldarriaga, W., F. Tassone, L. Y. Gonzalez-Teshima, J. V. Forero-Forero, S. Ayala-Zapata, and R. Hagerman. 2014. 'Fragile X syndrome', *Colomb Med (Cali)*, 45: 190-8.
- Sampath, S., S. Bhat, S. Gupta, A. O'Connor, A. B. West, D. E. Arking, and A. Chakravarti. 2013. 'Defining the contribution of CNTNAP2 to autism susceptibility', *PLoS One*, 8: e77906.
- Sanders, S. J., M. T. Murtha, A. R. Gupta, J. D. Murdoch, M. J. Raubeson, A. J. Willsey, A. G. Ercan-Sencicek, N. M. DiLullo, N. N. Parikshak, J. L. Stein, M. F. Walker, G. T. Ober, N. A. Teran, Y. Song, P. El-Fishawy, R. C. Murtha, M. Choi, J. D. Overton, R. D. Bjornson, N. J. Carriero, K. A. Meyer, K. Bilguvar, S. M. Mane, N. Sestan, R. P. Lifton, M. Gunel, K. Roeder, D. H. Geschwind, B. Devlin, and M. W. State. 2012. 'De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism', *Nature*, 485: 237-41.
- Sawicka, K., C. R. Hale, C. Y. Park, J. J. Fak, J. E. Gresack, S. J. Van Driesche, J. J. Kang, J. C. Darnell, and R. B. Darnell. 2019. 'FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory', *Elife*, 8.
- Scheetz, A. J., A. C. Nairn, and M. Constantine-Paton. 2000. 'NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses', *Nat Neurosci*, 3: 211-6.
- Scheiffele, P., J. Fan, J. Choih, R. Fetter, and T. Serafini. 2000. 'Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons', *Cell*, 101: 657-69.
- Schenck, A., B. Bardoni, A. Moro, C. Bagni, and J. L. Mandel. 2001. 'A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8844-9.
- Schreiner, D., J. N. Savas, E. Herzog, N. Brose, and J. de Wit. 2017. 'Synapse biology in the 'circuit-age'-paths toward molecular connectomics', *Curr Opin Neurobiol*, 42: 102-10.
- Sebat, J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, B. Yamrom, S. Yoon, A. Krasnitz, J. Kendall, A. Leotta, D. Pai, R. Zhang, Y. H. Lee, J. Hicks, S. J. Spence, A. T. Lee, K. Puura, T. Lehtimaki, D. Ledbetter, P. K. Gregersen, J. Bregman, J. S. Sutcliffe, V. Jobanputra, W. Chung, D. Warburton, M. C. King, D. Skuse, D. H. Geschwind, T. C. Gilliam, K. Ye, and M. Wigler. 2007. 'Strong association of de novo copy number mutations with autism', *Science*, 316: 445-9.
- Shahar, O. D., and E. M. Schuman. 2020. 'Large-scale cell-type-specific imaging of protein synthesis in a vertebrate brain', *Elife*, 9.
- Sharma, S. R., X. Gonda, and F. I. Tarazi. 2018. 'Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy', *Pharmacol Ther*, 190: 91-104.
- Sharon, G., N. J. Cruz, D. W. Kang, M. J. Gandal, B. Wang, Y. M. Kim, E. M. Zink, C. P. Casey, B. C. Taylor, C. J. Lane, L. M. Bramer, N. G. Isern, D. W. Hoyt, C. Noecker, M. J. Sweredoski, A. Moradian, E. Borenstein, J. K. Jansson, R. Knight, T. O. Metz, C. Lois, D. H. Geschwind, R. Krajmalnik-Brown, and S. K. Mazmanian. 2019. 'Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice', *Cell*, 177: 1600-18 e17.
- Sheng, M. 2003. '15 years of neuron cell biology', *Neuron*, 40: 193-7.
- Shipman, S. L., and R. A. Nicoll. 2012. 'A subtype-specific function for the extracellular domain of neuroligin 1 in hippocampal LTP', *Neuron*, 76: 309-16.
- Shipman, S. L., E. Schnell, T. Hirai, B. S. Chen, K. W. Roche, and R. A. Nicoll. 2011. 'Functional dependence of neuroligin on a new non-PDZ intracellular domain', *Nat Neurosci*, 14: 718-26.

- Singh, S. K., J. A. Stogsdill, N. S. Pulimood, H. Dingsdale, Y. H. Kim, L. J. Pilaz, I. H. Kim, A. C. Manhaes, W. S. Rodrigues, Jr., A. Pamukcu, E. Enustun, Z. Ertuz, P. Scheiffele, S. H. Soderling, D. L. Silver, R. R. Ji, A. E. Medina, and C. Eroglu. 2016. 'Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1alpha and NL1 via Hevin', *Cell*, 164: 183-96.
- Sittler, A., D. Devys, C. Weber, and J. L. Mandel. 1996. 'Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms', *Hum Mol Genet*, 5: 95-102.
- Smith, L. E., E. T. Barker, M. M. Seltzer, L. Abbeduto, and J. S. Greenberg. 2012. 'Behavioral phenotype of fragile X syndrome in adolescence and adulthood', *Am J Intellect Dev Disabil*, 117: 1-17.
- Soler-Llavina, G. J., M. V. Fuccillo, J. Ko, T. C. Sudhof, and R. C. Malenka. 2011. 'The neuroligin ligands, neuroligins and leucine-rich repeat transmembrane proteins, perform convergent and divergent synaptic functions in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16502-9.
- Sonderegger, P., and K. Matsumoto-Miyai. 2014. 'Activity-controlled proteolytic cleavage at the synapse', *Trends Neurosci*, 37: 413-23.
- Song, J., F. Li, A. Leier, T. T. Marquez-Lago, T. Akutsu, G. Haffari, K. C. Chou, G. I. Webb, R. N. Pike, and J. Hancock. 2018. 'PROSPERous: high-throughput prediction of substrate cleavage sites for 90 proteases with improved accuracy', *Bioinformatics*, 34: 684-87.
- Song, J. Y., K. Ichtchenko, T. C. Sudhof, and N. Brose. 1999. 'Neuroigin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 1100-5.
- Speed, H. E., I. Masiulis, J. R. Gibson, and C. M. Powell. 2015. 'Increased Cortical Inhibition in Autism-Linked Neuroigin-3R451C Mice Is Due in Part to Loss of Endocannabinoid Signaling', *PLoS One*, 10: e0140638.
- Stefani, G., C. E. Fraser, J. C. Darnell, and R. B. Darnell. 2004. 'Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells', *J Neurosci*, 24: 7272-6.
- Stogsdill, J. A., J. Ramirez, D. Liu, Y. H. Kim, K. T. Baldwin, E. Enustun, T. Ejikeme, R. R. Ji, and C. Eroglu. 2017. 'Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis', *Nature*, 551: 192-97.
- Sudhof, T. C. 2008. 'Neuroligins and neuorexins link synaptic function to cognitive disease', *Nature*, 455: 903-11.
- . 2018. 'Towards an Understanding of Synapse Formation', *Neuron*, 100: 276-93.
- Sutton, M. A., and E. M. Schuman. 2006. 'Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory', *Cell*, 127: 49-58.
- Suzuki, K., Y. Hayashi, S. Nakahara, H. Kumazaki, J. Prox, K. Horiuchi, M. Zeng, S. Tanimura, Y. Nishiyama, S. Osawa, A. Sehara-Fujisawa, P. Saftig, S. Yokoshima, T. Fukuyama, N. Matsuki, R. Koyama, T. Tomita, and T. Iwatsubo. 2012. 'Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1', *Neuron*, 76: 410-22.
- Sztainberg, Y., and H. Y. Zoghbi. 2016. 'Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders', *Nat Neurosci*, 19: 1408-17.
- Tabuchi, K., J. Blundell, M. R. Etherton, R. E. Hammer, X. Liu, C. M. Powell, and T. C. Sudhof. 2007. 'A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice', *Science*, 318: 71-6.
- The, Lancet. 2019. 'lcd-11', *Lancet*, 393: 2275.
- Thomson, S. R., S. S. Seo, S. A. Barnes, S. R. Louros, M. Muscas, O. Dando, C. Kirby, D. J. A. Wyllie, G. E. Hardingham, P. C. Kind, and E. K. Osterweil. 2017. 'Cell-Type-Specific Translation Profiling Reveals a Novel Strategy for Treating Fragile X Syndrome', *Neuron*, 95: 550-63 e5.
- Thoumine, O., H. Ewers, M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht, G. Giannone, C. Poujol, P. Legros, B. Lounis, L. Cognet, and D. Choquet. 2008. 'Probing the dynamics of protein-protein interactions at neuronal contacts by optical imaging', *Chem Rev*, 108: 1565-87.

- Tiedge, H., and J. Brosius. 1996. 'Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture', *J Neurosci*, 16: 7171-81.
- Till, S. M., A. Asiminas, A. D. Jackson, D. Katsanevaki, S. A. Barnes, E. K. Osterweil, M. F. Bear, S. Chattarji, E. R. Wood, D. J. Wyllie, and P. C. Kind. 2015. 'Conserved hippocampal cellular pathophysiology but distinct behavioural deficits in a new rat model of FXS', *Hum Mol Genet*, 24: 5977-84.
- Ting, J. T., and G. Feng. 2011. 'Unfolding neurodevelopmental disorders: found in translation', *Nat Med*, 17: 1352-3.
- Torre, E. R., and O. Steward. 1992. 'Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies', *J Neurosci*, 12: 762-72.
- Trimble, R. B., and A. L. Tarentino. 1991. 'Identification of distinct endoglycosidase (endo) activities in *Flavobacterium meningosepticum*: endo F1, endo F2, and endo F3. Endo F1 and endo H hydrolyze only high mannose and hybrid glycans', *J Biol Chem*, 266: 1646-51.
- Tu, R., J. Qian, M. Rui, N. Tao, M. Sun, Y. Zhuang, H. Lv, J. Han, M. Li, and W. Xie. 2017. 'Proteolytic cleavage is required for functional neuroligin 2 maturation and trafficking in *Drosophila*', *J Mol Cell Biol*, 9: 231-42.
- Ulbrich, L., F. L. Favaloro, L. Trobiani, V. Marchetti, V. Patel, T. Pascucci, D. Comoletti, S. J. Marciniak, and A. De Jaco. 2016. 'Autism-associated R451C mutation in neuroligin3 leads to activation of the unfolded protein response in a PC12 Tet-On inducible system', *Biochem J*, 473: 423-34.
- Ule, J., K. B. Jensen, M. Ruggiu, A. Mele, A. Ule, and R. B. Darnell. 2003. 'CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain', *Science*, 302: 1212-5.
- Ushkaryov, Y. A., A. G. Petrenko, M. Geppert, and T. C. Sudhof. 1992. 'Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin', *Science*, 257: 50-6.
- Vafadari, B., A. Salamian, and L. Kaczmarek. 2016. 'MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy', *J Neurochem*, 139 Suppl 2: 91-114.
- Varoqueaux, F., G. Aramuni, R. L. Rawson, R. Mohrmann, M. Missler, K. Gottmann, W. Zhang, T. C. Sudhof, and N. Brose. 2006. 'Neuroligins determine synapse maturation and function', *Neuron*, 51: 741-54.
- Varoqueaux, F., S. Jamain, and N. Brose. 2004. 'Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses', *Eur J Cell Biol*, 83: 449-56.
- Vasilyev, N., A. Polonskaia, J. C. Darnell, R. B. Darnell, D. J. Patel, and A. Serganov. 2015. 'Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a beta-turn in the RGG motif of FMRP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E5391-400.
- Vassar, R., D. M. Kovacs, R. Yan, and P. C. Wong. 2009. 'The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential', *J Neurosci*, 29: 12787-94.
- Venkatesh, H. S., T. B. Johung, V. Caretti, A. Noll, Y. Tang, S. Nagaraja, E. M. Gibson, C. W. Mount, J. Polepalli, S. S. Mitra, P. J. Woo, R. C. Malenka, H. Vogel, M. Bredel, P. Mallick, and M. Monje. 2015. 'Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion', *Cell*, 161: 803-16.
- Venkatesh, H. S., L. T. Tam, P. J. Woo, J. Lennon, S. Nagaraja, S. M. Gillespie, J. Ni, D. Y. Duveau, P. J. Morris, J. J. Zhao, C. J. Thomas, and M. Monje. 2017. 'Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma', *Nature*, 549: 533-37.
- Verheij, C., E. de Graaff, C. E. Bakker, R. Willemsen, P. J. Willems, N. Meijer, H. Galjaard, A. J. Reuser, B. A. Oostra, and A. T. Hoogeveen. 1995. 'Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues', *Hum Mol Genet*, 4: 895-901.

- Verity, M. A., W. J. Brown, and M. Cheung. 1980. 'Isolation of ribosome containing synaptosome subpopulation with active in vitro protein synthesis', *J Neurosci Res*, 5: 143-53.
- Verkerk, A. J., M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. P. Zhang, and et al. 1991. 'Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome', *Cell*, 65: 905-14.
- Verma, V., A. Paul, A. Amrapali Vishwanath, B. Vaidya, and J. P. Clement. 2019. 'Understanding intellectual disability and autism spectrum disorders from common mouse models: synapses to behaviour', *Open Biol*, 9: 180265.
- Vu, T. H., J. M. Shipley, G. Bergers, J. E. Berger, J. A. Helms, D. Hanahan, S. D. Shapiro, R. M. Senior, and Z. Werb. 1998. 'MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes', *Cell*, 93: 411-22.
- Weiler, I. J., S. A. Irwin, A. Y. Klintsova, C. M. Spencer, A. D. Brazelton, K. Miyashiro, T. A. Comery, B. Patel, J. Eberwine, and W. T. Greenough. 1997. 'Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 5395-400.
- Wieder, S., and S. I. Greenspan. 2003. 'Climbing the symbolic ladder in the DIR model through floor time/interactive play', *Autism*, 7: 425-35.
- Wlodarczyk, J., I. Mukhina, L. Kaczmarek, and A. Dityatev. 2011. 'Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity', *Dev Neurobiol*, 71: 1040-53.
- Wolff, J. J., J. W. Bodfish, H. C. Hazlett, A. A. Lightbody, A. L. Reiss, and J. Piven. 2012. 'Evidence of a distinct behavioral phenotype in young boys with fragile X syndrome and autism', *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 51: 1324-32.
- Wozniak, R. H., N. B. Leezenbaum, J. B. Northrup, K. L. West, and J. M. Iverson. 2016. 'The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity', *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*.
- . 2017. 'The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity', *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 8.
- Wu, J., N. Tao, Y. Tian, G. Xing, H. Lv, J. Han, C. Lin, and W. Xie. 2018. 'Proteolytic maturation of Drosophila Neuroligin 3 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme in the nervous system', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1862: 440-50.
- Xie, J., H. Jiang, Y. H. Wan, A. Y. Du, K. J. Guo, T. Liu, W. Y. Ye, X. Niu, J. Wu, X. Q. Dong, and X. J. Zhang. 2011. 'Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway', *J Mol Cell Biol*, 3: 250-9.
- Xu, J. Y., Q. Q. Xia, and J. Xia. 2012. 'A review on the current neuroligin mouse models', *Sheng Li Xue Bao*, 64: 550-62.
- Yan, J., G. Oliveira, A. Coutinho, C. Yang, J. Feng, C. Katz, J. Sram, A. Bockholt, I. R. Jones, N. Craddock, E. H. Cook, Jr., A. Vicente, and S. S. Sommer. 2005. 'Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients', *Mol Psychiatry*, 10: 329-32.
- Yang, C., J. Li, Q. Wu, X. Yang, A. Y. Huang, J. Zhang, A. Y. Ye, Y. Dou, L. Yan, W. Z. Zhou, L. Kong, M. Wang, C. Ai, D. Yang, and L. Wei. 2018. 'AutismKB 2.0: a knowledgebase for the genetic evidence of autism spectrum disorder', *Database (Oxford)*, 2018.
- Yasin, H., W. T. Gibson, S. Langlois, R. M. Stowe, E. S. Tsang, L. Lee, J. Poon, G. Tran, C. Tyson, C. K. Wong, M. A. Marra, J. M. Friedman, and F. R. Zahir. 2019. 'A distinct neurodevelopmental syndrome with intellectual disability, autism spectrum disorder, characteristic facies, and macrocephaly is caused by defects in CHD8', *J Hum Genet*, 64: 271-80.

- Yavas, E., S. Gonzalez, and M. S. Fanselow. 2019. 'Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory', *F1000Res*, 8.
- Young, D. A., M. J. Barter, and D. J. Wilkinson. 2019. 'Recent advances in understanding the regulation of metalloproteinases', *F1000Res*, 8.
- Zalfa, F., and C. Bagni. 2005. 'Another view of the role of FMRP in translational regulation', *Cell Mol Life Sci*, 62: 251-2.
- Zalfa, F., B. Eleuteri, K. S. Dickson, V. Mercaldo, S. De Rubeis, A. di Penta, E. Tabolacci, P. Chiurazzi, G. Neri, S. G. Grant, and C. Bagni. 2007. 'A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability', *Nat Neurosci*, 10: 578-87.
- Zang, J. B., E. D. Nosyreva, C. M. Spencer, L. J. Volk, K. Musunuru, R. Zhong, E. F. Stone, L. A. Yuva-Paylor, K. M. Huber, R. Paylor, J. C. Darnell, and R. B. Darnell. 2009. 'A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation', *PLoS Genet*, 5: e1000758.
- Zhan, Y., R. C. Paolicelli, F. Sforazzini, L. Weinhard, G. Bolasco, F. Pagani, A. L. Vyssotski, A. Bifone, A. Gozzi, D. Ragozzino, and C. T. Gross. 2014. 'Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior', *Nat Neurosci*, 17: 400-6.
- Zhang, B., E. Seigneur, P. Wei, O. Gokce, J. Morgan, and T. C. Sudhof. 2017. 'Developmental plasticity shapes synaptic phenotypes of autism-associated neuroligin-3 mutations in the calyx of Held', *Mol Psychiatry*, 22: 1483-91.
- Zhang, B., and T. C. Sudhof. 2016. 'Neuroligins Are Selectively Essential for NMDAR Signaling in Cerebellar Stellate Interneurons', *J Neurosci*, 36: 9070-83.
- Zhang, C., J. M. Milunsky, S. Newton, J. Ko, G. Zhao, T. A. Maher, H. Tager-Flusberg, M. F. Bolliger, A. S. Carter, A. A. Boucard, C. M. Powell, and T. C. Sudhof. 2009. 'A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export', *J Neurosci*, 29: 10843-54.
- Zhang, Y., K. Chen, S. A. Sloan, M. L. Bennett, A. R. Scholze, S. O'Keefe, H. P. Phatnani, P. Guarnieri, C. Caneda, N. Ruderisch, S. Deng, S. A. Liddelow, C. Zhang, R. Daneman, T. Maniatis, B. A. Barres, and J. Q. Wu. 2014. 'An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex', *J Neurosci*, 34: 11929-47.
- Zhang, Y., S. A. Sloan, L. E. Clarke, C. Caneda, C. A. Plaza, P. D. Blumenthal, H. Vogel, G. K. Steinberg, M. S. Edwards, G. Li, J. A. Duncan, 3rd, S. H. Cheshier, L. M. Shuer, E. F. Chang, G. A. Grant, M. G. Gephart, and B. A. Barres. 2016. 'Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse', *Neuron*, 89: 37-53.